Printed in Switzerland • S. KARGER BASEL - NEW YORK • SEPARATUM • Printed in Switzerland • S. KARGER BASEL - NEW YORK • SEPARATUM

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Bern
(Direktor: Prof. Dr. *H. Aebi*)

Die Ontogenese von zytoplasmatischen Enzymen beim Hühnerembryo

Gekürzte Fassung der

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Hans Max EPPENBERGER
aus Basel und Mogelsberg (St. Gallen)

Basel, 1963

Verlag S. Karger in Basel

1962

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. *H. Aebi* und Dr. *A. Portmann.*

Basel, den 27. November 1962

M. Eichler, Dekan

Herrn Hans Max Eppenberger wurde von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel am 27. November 1962 erlaubt, diese gekürzte Fassung seiner am 27. November 1962 genehmigten Inauguraldissertation drucken zu lassen. Die vollinhaltliche Arbeit mit dem Titel:

Die Ontogenese der zytoplasmatischen Enzyme beim Hühnerembryo

kann eingesehen oder entliehen werden:

1. in der Zoologischen Anstalt der Universität Basel;
2. im Medizinisch-chemischen Institut der Universität Bern;
3. in der Universitätsbibliothek Basel;
4. in der Schweizerischen Landesbibliothek in Bern

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK LEIDEN

Separatdruck aus «Enzymologia biologica et clinica»
Band 2, Heft 3, Jahrgang 1962/1963

Die Ontogenese von zytoplasmatischen Enzymen beim Hühnerembryo

Zusammenfassung. 1. Es wird die ontogenetische Entwicklung von zytoplasmatischen Enzymen beim Huhn vom 3. Embryonaltag bis zum Adulttier untersucht. Die Untersuchungen betreffen vor allem die glykolytischen Enzyme; zu Vergleichszwecken werden einige nicht glykolytische Enzyme mituntersucht.

2. Es werden einerseits die individuelle Entwicklung und Differenzierung der einzelnen Enzyme, andererseits fünf Organe (Leber, Niere, S-Muskel, Herz, Gehirn) in bezug auf ihre Enzymontogenese vergleichend untersucht. Schließlich wird bei verschiedenen Stadien das glykolytische Enzymverteilungsmuster diskutiert.

3. Es wird eine atypische Glykolyse bei den fünf untersuchten Organen im Embryonalstadium diskutiert.

4. Es wird nachgewiesen, daß Untersuchungen am Totalembryo in bezug auf die Enzymentwicklung zu falschen Schlüssen führen müssen. Jedes Enzym macht in jedem Zelltyp, sowohl in bezug auf Beginn als auch auf die Größe der Synthese eine individuelle Entwicklung durch.

5. Es wird auf Grund der aufgestellten Enzymverteilungsmuster der Glykolyse die Frage der Limitierung des Substratflusses durch bestimmte Enzyme aufgeworfen.

The Ontogenesis of Cytoplasmatic Enzymes of the Chick Embryo

Summary. (1) The development of cytoplasmatic enzymes has been investigated in the chicken from the 3rd day of incubation to the adult animal. Most glycolytic enzymes and some other enzymes were studied.

(2) Enzyme assays were performed in isolated kidneys, hearts, brains, livers and skeletal muscle tissues and referred to fresh weight and protein content.

(3) It is shown that each enzyme follows its individual pattern in respect to quantitative development and that the enzyme patterns during development are organ specific.

(4) The results suggest that in the early stages of development glycolysis may be atypical.

(5) The relationship between enzymes and organ differentation, growth and metabolism are discussed.

Die ontogenetische Entwicklung von Enzymen wurde bisher nur wenig untersucht. Die einseitige Betrachtung der Enzyme als Biokatalysatoren und nicht auch als Strukturbestandteile verleitete zur Annahme, daß die Rolle der Enzyme der Strukturdifferenzierung untergeordnet sei. Erst neuere Untersuchungen zeigten, daß die Enzymentwicklung selbst einen integrierenden Bestandteil der Differenzierung darstellt [33]. Damit war der Standpunkt, den *Krogh* [24] bereits 1914 eingenommen hatte, wieder aktuell geworden, daß nämlich:

«der Metabolismus beim Embryo nicht zur Hauptsache mit dem ‚Werk der Entwicklung' verbunden sei, sondern eine Funktion der Menge des in jedem Stadium vorhandenen organisierten Materiales sei.»

Aus dieser Arbeitshypothese drängen sich zwei Fragestellungen auf. Erstens die Frage, ob die Enzyme als solche bereits in der Keimzelle präformiert sind, oder ob erst das fortschreitende Wachstum des embryonalen Gewebes auch die Differenzierung des Enzymeiweißes bedingt. Hier wiederholt sich heute auf biochemischem Gebiet die alte Kontroverse zwischen «Präformisten» und «Epigenetikern». Sowohl die erste [4, 10] wie auch die zweite Auffassung [9, 46] hat ihre Vertreter. Zweitens stellt sich die Frage, ob die Strukturentwicklung gesondert von der Enzymentwicklung zu betrachten sei, oder ob hier dasselbe Phänomen von zwei Seiten betrachtet vorliege. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, daß das gesamte Zelleiweiß als Enzymeiweiß zu betrachten ist. Diese Auffassung wird auch von Embryologen vertreten [33, 50]. Es sei in diesem Zusammenhang auf die Arbeiten von *Virtanen und De Ley* [57] und von *Beisenherz et al.* [1] hingewiesen.

Vom biologischen Standpunkt aus müssen zwei Gruppen von Enzymen unterschieden werden. Auf der einen Seite stehen jene Enzyme, die ihre Funktion im Zellverband erst dann aufnehmen, wenn die Embryonalentwicklung und damit die Organisation dieses Verbandes entsprechend fortgeschritten ist. Das Enzym kann vorhanden sein. Seine volle Aktivität wird es parallel zur Differenzierung der Struktur, an welche es gebunden ist, erhalten. Auf der andern Seite stehen jene Enzyme, die für die Erhaltung des Lebens essentiell sind. Von diesen Enzymen muß man annehmen, daß sie bereits von Anfang an vorhanden sind, um eine genügende Energieproduktion zu gewährleisten. Es erscheint sinngemäß, solche Enzyme der Energieproduktion als Untersuchungsobjekt für die Kardinalfragen der Enzymentwicklung – Zeitpunkt ihres Auftretens und Lokalisation – auszuwählen.

Bisherige Untersuchungen über Enzymentwicklung erfolgten fast ausschließlich mit Enzymen des ersten Types. Es war naheliegend, die Ontogenese organ- und funktionsspezifischer Enzyme mit der Organ- und Funktionsentwicklung zu korrelieren (z. B. Cholinesterase). Auf der Suche nach den primären Energiequellen konnten *Warburg et al.* [59] bereits 1924 nachweisen, daß der Hühnerembryo unter anaeroben Bedingungen bis zu 9 %/h seines Eigengewichtes an Laktat produziert. Die Glykolyse muß daher als Energiequelle voll arbeitsfähig sein und stellt wahrscheinlich die primäre Form der Energieproduktion dar. *Needham* [35] äußerte 1931 die Vermutung, daß ontogenetisch die Kohlenhydrate als erste Energiequelle zur Verfügung stehen. Metabolitmessungen führten dann 1948 *Novikoff et al.* [37] zur Annahme, daß bereits beim 3 Tage alten Hühnerembryo die Glykolyse ebenso funktionstüchtig sein müsse wie beim erwachsenen Tier. Als nächstes drängte es sich nun aber auf, nicht nur Substratbestimmungen als indirekte Zeichen der Enzymdifferenzierung, sondern Enzymanalysen selbst durchzuführen. Dabei handelt es sich meist um Untersuchungen aus der Sicht der chemischen Enzymologie, und nicht der biologischen Enzymologie.

Die Ausarbeitung und technische Verfeinerung des von *Warburg und Christian* [60] entwickelten «Optischen Tests» ermöglichen heute, nebeneinander eine große Anzahl verschiedener Enzymaktivitäten zuverlässig zu bestimmen. So können die Entwicklung und Differenzierung einzelner Enzyme ontogenetisch verfolgt, bei verschiedenen Entwicklungsstadien ein Enzymverteilungsmuster aufgestellt und schließlich auch mehrere Organe miteinander verglichen werden. Damit tritt die Enzymologie als dritte Möglichkeit der Beobachtung der Ontogenese neben Morphologie und Physiologie. So wie vor hundert Jahren eine Topographie in morphologischer Hinsicht geschaffen worden ist, wird es Aufgabe dieser deskriptiven Enzymologie sein, eine Topographie der in jedem Organ, in jeder Zelle, zu jedem Zeitpunkt vorliegenden Biokatalysatoren zu entwerfen.

Material und Methodik

Tiermaterial. Die Embryonen stammten aus einer Zuchtgruppe der weißen Leghornrasse aus dem Stamm der Firma Dr. A. Wander AG in Oberwangen bei Bern. Die Inkubation der Eier erfolgte im Institut. Zur Beurteilung der Entwicklungsstadien wurden die folgenden Kriterien herangezogen:

1. Die Feuchtgewichte der einzelnen Embryonen.

2. Der optische Vergleich mit den Stadien von *Lillie* [28] bzw. *Hamburger et al.* [16].

3. Die Inkubationsdauer.

Auf Abbildung 1 sind die ermittelten Gewichte und als Vergleichswerte die Resultate einer zweiten Inkubationsserie und die Messungen von *Schmalhausen* [47] zusammen aufgetragen. Es erwies sich für die ontogenetischen Untersuchungen der Enzymaktivitäten als günstig, die Werte von je zwei Inkubationstagen zusammenzufassen.

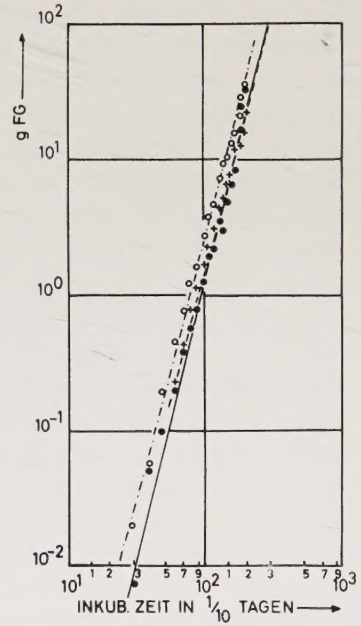

Abb. 1. Gewichtszunahme von Hühnerembryonen, aufgetragen in $^1/_{10}$ Tagen: (●) Untersuchte Embryonen; (+) Kontrollwerte; (○) nach Schmalhausen.

Fig. 1. Increase of weight of chick embryos in $^1/_{10}$ *days:* (●) *tested embryos;* (+) *controls;* (○) *data of Schmalhausen.*

Präparation der Organe. Von Embryonalstadien, die weniger als drei volle Tage inkubiert waren, konnten keine definierten Organe präpariert werden. Das Herauspräparieren der fünf untersuchten Organe (Leber, Niere, Hinterextremitätenmuskulatur, Herz und Prosenzephalon) erfolgte bei jüngeren Stadien in einer isotonischen NaCl-Lösung bei Körpertemperatur; erst die präparierten Organe wurden in eisgekühlte Schalen verbracht und bei tiefer Temperatur bis zur Weiterverarbeitung gehalten. Nach drei Inkubationstagen war die Körperdifferenzierung soweit fortgeschritten, daß die Teilung des Körpers in Pleural-, Pericardial- und Peritonealhöhlen erkannt werden konnte; alle drei Körperhöhlen standen aber noch mitein-

ander in Verbindung. In diesem Zeitpunkt wurden die Untersuchungen begonnen. Bei sehr jungen Stadien mußten bis zu fünfzig Individuen in einem Pool vereinigt werden. Die Präparation der Niere war erst vom vierten Tage an möglich. Etwa am neunten Inkubationstag erfolgte die Ablösung des Mesonephros durch das Metanephros.

Histologie. Um die Möglichkeit zu haben, interessante Entwicklungsverläufe im enzymologischen Bereich mit der morphologischen Differenzierung zu vergleichen. wurde parallel von allen Stadien eine Schnittserie hergestellt.

Homogenatbereitung. Die Organproben wurden mit neun Teilen einer Saccharoselösung (0,25 M, 5 mM EDTA) in eisgekühlten Mikroglashomogenisatoren nach Potter-Elvehjem ½–1 min homogenisiert und während 5 min bei 8000 g (15 000 RPM) in einer Spinco Mikrozentrifuge zentrifugiert. Alle Enzymaktivitäten wurden im Überstand gemessen. Die erhaltenen Überstände wurden sogleich über Trockeneis eingefroren und in diesem Zustand bis zur Enzymaktivitätsbestimmung aufbewahrt. Ein Aktivitätsverlust durch längeres Aufbewahren in gefrorenem Zustand konnte nicht beobachtet werden [14]. Ähnliche Erfahrungen machte auch *Wallace* [58].

Bestimmungsmethoden. Alle Bestimmungen wurden mit dem «Optischen Test» durchgeführt. Die Ausarbeitung bzw. Modifikation der angewandten Aktivitätsbestimmungsmethoden wurden schon früher beschrieben [14]. Von grundlegender Bedeutung war die Bestimmung von Enzymen im Ultramikromaßstab. Bestimmt wurden 14 Enzymaktivitäten*. Die meisten Enzyme wurden in derjenigen Richtung des Gleichgewichtes gemessen, in der der größere Substratumsatz erfolgte (Ausnahme: F-1,6-P-A). Die Messungen wurden bei einer Wellenlänge von 366 nm – sowohl für die Oxydation von $NADH_2$, wie auch für die Reduktion von NADP – mit einem Eppendorf-Spektrallinien-Photometer durchgeführt. Als Registriergerät diente ein WW-Lineardirektschreiber (Firma Dr. A. Vaudaux, Binningen, Schweiz). Alle Messungen erfolgten bei pH 7,5 und in thermostabilisierten Küvetten bei 25° C ±0,5° C. Nur die KK wurde nach der von *Colombo et al.* [11] modifizierten Methode von *Tanzer et al.* [55] bei einem pH von 9,0 und bei einer Temperatur von 37° C ± 0,5° C bestimmt. Bei allen Enzymen lagen Reaktionen nullter Ordnung vor. Die Verdünnung des Überstandes für die Analysen erfolgte mit destilliertem Wasser. Als Einheit wurde die von der «Commission on Enzymes of the Int. Union of Biochemistry» 1961 als verbindlich erklärte «International Unit» (IU), d. h. µMol/min/gFG (Feuchtgewicht) bzw. µMol/min/mg Protein gewählt. Die Eiweißbestimmung erfolgte nach der Methode von Folin und Ciocalteu in der Modifikation von *Lowry et al.* [30]. Es zeigte sich, daß eine Bezugnahme der Aktivität auf die ermittelten Eiweißwerte zu relativ stark voneinander abweichenden Werten führte, die von der großen Streuungsanfälligkeit der Methode herrührten. Aus diesem Grunde wurde der Bezugnahme auf das Feuchtgewicht der Vorrang gegeben. Die ermittelten Pro-

* Hexokinase (HEX), Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-P-DH), Hexosephosphatisomerase (HP-I), Fruktose-6-Phosphatkinase (F-6-P-K), Glyzerin-1-Phosphatdehydrogenase (P-GLY-DH), Fruktose-1,6-Diphosphataldolase (F-1,6-P-A), Glyzerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAP-DH), Phosphoglyzerokinase (P-GLY-K), Enolase (ENO), Pyruvatkinase (PYR-K), Laktatdehydrogenase (LDH), Glutaminat-Oxalazetat-Transaminase (GOT), Isozitratdehydrogenase (IC-DH), Kreatin-Kinase (KK).

teinwerte für die fünf Organe und alle Entwicklungsstadien sind in Tabelle I zusammengefaßt.

TABELLE I

Eiweißwerte in mg lösliches Eiweiß pro g Frischgewicht

Inkubationstage	Leber		Niere		S-Muskel		Herz		Gehirn	
	$\bar{x}$	$\pm s$	$\bar{x}$	$\pm s$	$\bar{x}$	$\pm s$	$\bar{x}$	$\pm s$	$\bar{x}$	$\pm s$
3	40	45,3	81	–	35	30,7	32	25,3	30	22,9
5	68	3,1	35	11,0	50	8,5	95	87,8	46	9,6
7	84	42,1	57	25,5	51	28,1	44	25,0	76	23,0
9	77	14,6	54	19,0	36	16,7	42	16,5	45	14,3
11	196	87,3	109	33,9	44	20,0	59	19,7	75	12,2
13	162	95,6	62	39,3	36	14,9	43	14,1	57	11,0
15	166	121	80	30,6	60	28,1	63	21,2	89	78,9
17	103	25,6	65	18,9	38	17,7	44	19,5	49	18,4
19	83	2,6	62	18,9	18	5,0	26	7,1	39	11,8
S	94	28,8	70	26,8	10	5,1	30	18,0	69	25,9
S + 10	89	25,7	81	16,6	20	3,3	16	4,9	50	20,1
S + 15	118	27,1	123	34,5	32	2,4	32	8,2	92	27,8
E	120	–	94	–	36	–	42	–	51	–

Statistische Angaben. Die Verläßlichkeit der gemessenen Werte wurde varianzanalytisch geprüft. Für die einzelnen Stadien, Enzyme und Organe wurde jeweils die Standardabweichung berechnet.

Ergebnisse

Allgemeine Beobachtungen. Es wurde die spezifische Aktivität von vierzehn Enzymen im Homogenatüberstand von Leber, Niere, Skelettmuskel, Herz und Gehirn von Hühnerembryonen sowie nach dem Schlüpfen und bei ausgewachsenen Hühnern gemessen. In den Tabellen II–XV sind die Meßwerte und deren Streuungen zusammengestellt. Zur Darstellung der ontogenetischen Entwicklung der einzelnen Enzyme dienen die Abbildungen 2–5. Die Abbildungen 6–10 geben einen Überblick über das glykolytische Enzymverteilungsmuster in vier Stadien bei verschiedenen Organen. Zu deren Charakterisierung wurde eine Darstellungsart gewählt, die in horizontaler Richtung ein stark vereinfachtes Bild des zytoplasmatischen Raumes (ZYT) und der mit ihm in Verbindung stehenden extrazellulären (EZR) und

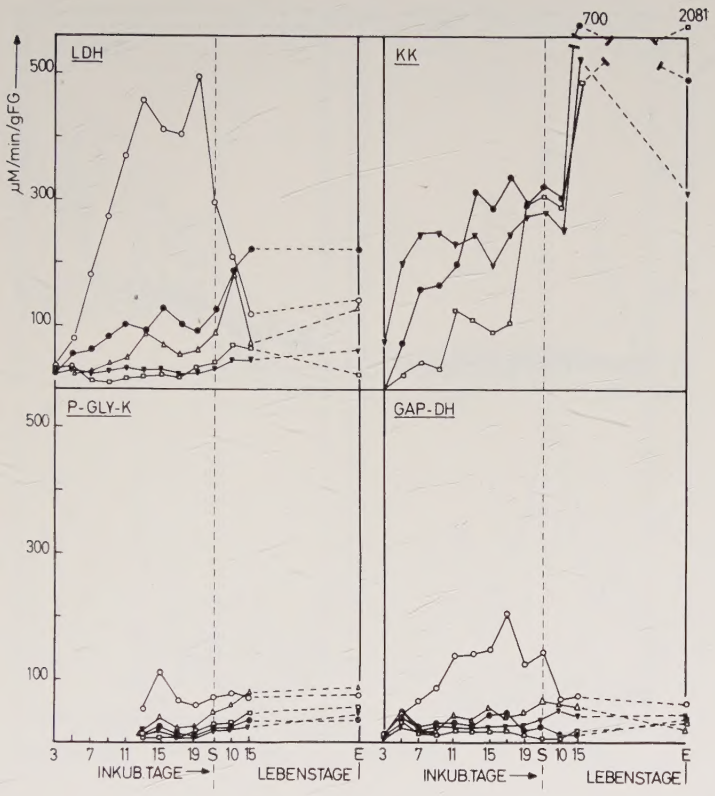

Abb. 2. Entwicklung von LDH, KK, P-GLY-K, GAP-DH. (○) Leber, (△) Niere, (□) S-Muskel, (●) Herz, (▼) Gehirn.

Fig. 2. Development of LDH, KK, P-GLY-K, GAP-DH. (○) *liver*, (△) *kidney*, (□) *s-muscle*, (●) *heart*, (▼) *brain.*

mitochondrialen (MIT) Räume zeigt. In vertikaler Richtung verläuft die Glykolyse zwischen dem Edukt Glykogen und dem Produkt Laktat als Funktion der Enzymaktivitäten. Dabei drückt die Breite eines Blockes die jeweilige Enzymaktivität maßstabgerecht in µM/min/gFG aus. Unterbrochen gezeichnete Linien bedeuten nicht-gemessene Enzymaktivitäten.

Die Beobachtung der Enzymentwicklung bringt eine Reihe von Problemen mit sich, auf die einleitend kurz hingewiesen werden muß.

1. *Die Frage der biochemischen Heterogenität:* Während bisher überwiegend Experimente am Totalembryo durchgeführt worden sind, wurde bei diesen Untersu-

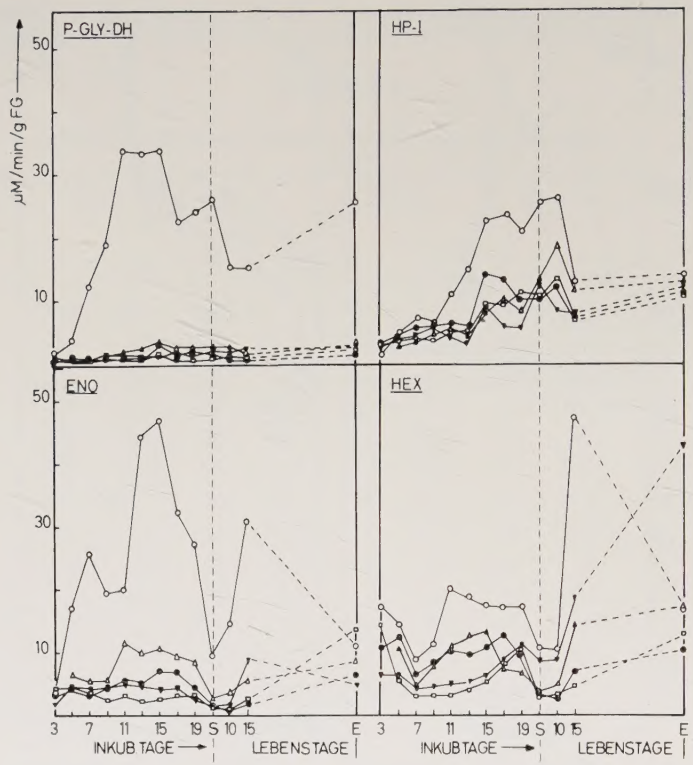

Abb. 3. Entwicklung von P-GLY-DH, HP-I, ENO, HEX. (○) Leber, (△) Niere, (□) S-Muskel, (●) Herz, (▼) Gehirn.

Fig. 3. Development of P-GLY-DH, HP-I, ENO, HEX. (○) *liver*, (△) *kidney*, (□) *s-muscle*, (●) *heart*, (▼) *brain.*

chungen bewußt auf die Spezifität der einzelnen Organe in bezug auf die Enzymverteilung eingegangen.

2. *Die fehlende Organkontinuität:* Um die bei einzelnen Organen im Ablauf der Entwicklung fehlende Organkontinuität (Skelettmuskel, Leber, Niere) berücksichtigen zu können, wurden histologische Untersuchungen durchgeführt.

3. *Die Zellheterogenität:* Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich aus der Tatsache, daß bei den Enzymaktivitätsbestimmungen in ganzen Organen der sehr heterogene histologische Aufbau dieser Organe aus verschiedenen Zelltypen nicht berücksichtigt werden kann. Die Enzymaktivitäten weichen in einzelnen Zelltypen möglicherweise stark voneinander ab.

4. *Die subzelluläre Struktur:* Bei der Beurteilung der vorliegenden Resultate muß auch beachtet werden, daß der hier als C-Raum bezeichnete Teil der Zelle ein vereinfachtes Bild der Zellorganisation wiedergibt. Die submikroskopische Struktur

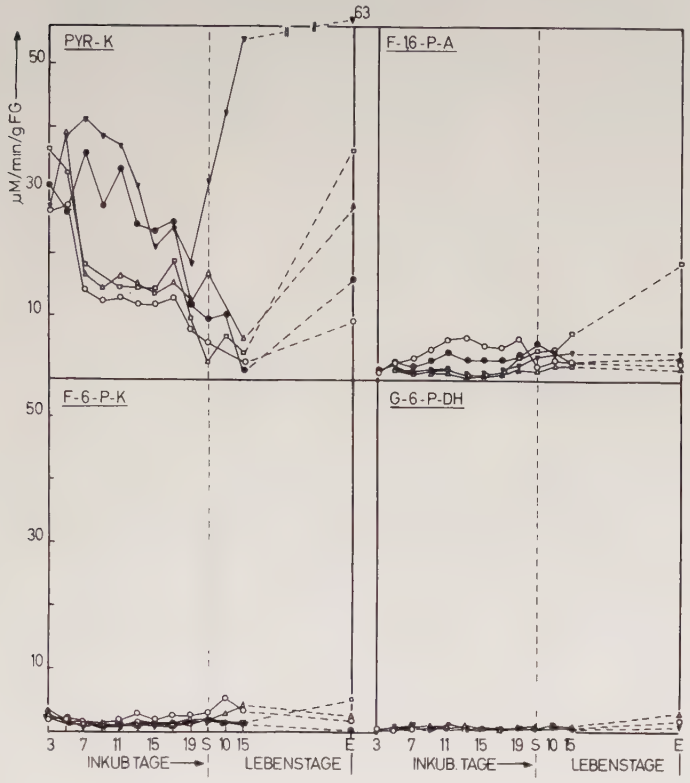

Abb. 4. Entwicklung von PYR-K, F-1,6-PA, F-6-P-K, G-6-P-DH. (○) Leber, (△) Niere, (□) S-Muskel, (●) Herz, (▼) Gehirn.

Fig. 4. Development of PYR-K, F-1,6-PA, F-6-P-K, G-6-P-DH. (○) *liver*, (△) *kidney*, (□) *s-muscle*, (●) *heart*, (▼) *brain.*

des Zytoplasmas wie auch die Wechselwirkung zwischen den morphologischen Einheiten der Zelle wurden vernachlässigt. Es ist möglich, daß einzelne Enzyme an das endoplasmatische Retikulum gebunden sind und nicht im gelösten Zustande vorliegen. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob es überhaupt statthaft ist, den C-Raum von den übrigen Organellen abgetrennt zu untersuchen. Da $NADH_2$ und $NADPH_2$ nicht durch die Mitochondrienmembran permeieren, braucht auf diese Frage aber kein großes Gewicht gelegt zu werden. So haben *Delbrück et al.* [13] dargelegt, daßgesetzmäßige Beziehungen zwischen den Enzymen des C-Raumes und den intravitalen Metabolitkonzentrationen bestehen.

5. *Die Enzymheterogenität:* Endlich ist die, aus neuesten Untersuchungen bekanntgewordene Tatsache zu berücksichtigen, daß nicht einmal das einzelne Enzym homogen sein muß, sondern zumindest die LDH und IC-DH in verschiedenen molekularen Spezies, sogenannte Isoenzymen, auftreten können.

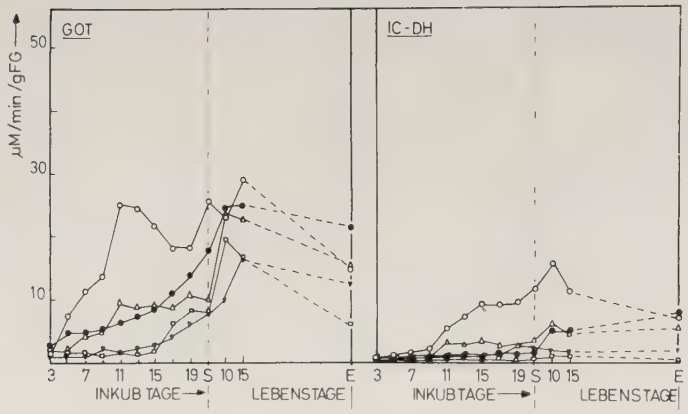

Abb. 5. Entwicklung von GOT, IC-DH. (○) Leber, (△) Niere, (□) S-Muskel, (●) Herz, (▼) Gehirn.

Fig. 5. Development of GOT, IC-DH. (○) *liver*, (△) *kidney*, (□) *s-muscle*, (●) *heart*, (▼) *brain.*

TABELLE II

LDH-Aktivität in µMol/min/gFG

Inkubations-tage	Leber		Niere		S-Muskel		Herz		Gehirn	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
3	32,8	12,8	79,2	–	33,8	16,8	29,1	14,5	26,9	7,6
5	80,9	46,1	25,5	10,9	36,4	16,5	56,0	9,8	31,9	17,7
7	183	58,8	28,6	4,7	17,9	9,4	59,6	15,7	24,7	2,2
9	276	71,5	40,8	24,2	14,0	4,5	83,2	49,8	31,1	16,3
11	370	62,5	48,1	11,7	18,4	5,3	136	42,5	34,7	10,1
13	459	179	90,1	35,3	20,5	8,0	91,8	21,5	26,9	6,1
15	413	208	70,9	45,6	25,0	10,4	128	51,1	27,5	7,9
17	407	175	54,3	11,4	20,7	8,5	103	32,0	23,5	5,0
19	493	178	65,4	31,4	36,1	13,1	94,0	10,5	27,9	8,9
S	297	139	89,0	59,4	40,0	17,5	124	24,2	32,0	5,1
S + 10	210	32,0	181	43,9	70,0	15,0	183	40,0	51,0	14,7
S + 15	120	32,9	74,8	5,3	67,0	22,0	239	49,1	49,0	17,9
E	156	32,9	132	29,3	27,0	26,3	225	80,3	68,5	15,8

TABELLE III

HP-I-Aktivität in µMol/min/gFG

Inkubations-tage	Leber		Niere		S-Muskel		Herz		Gehirn	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
3	1,6	1,4	–	–	2,7	2,3	3,6	1,8	2,5	1,1
5	5,1	2,3	3,1	2,3	3,2	1,3	4,8	2,2	4,4	2,1
7	7,3	1,2	3,7	0,3	3,8	0,8	5,9	1,3	4,7	0,9
9	6,9	1,2	4,9	0,8	3,8	1,9	6,7	5,4	5,3	1,4
11	10,7	3,8	5,6	2,1	5,2	0,9	6,5	2,1	4,3	1,3
13	15,2	4,3	4,7	1,8	4,4	2,1	6,0	1,7	3,2	0,9
15	22,9	9,5	8,4	1,5	9,5	4,1	14,3	3,4	8,6	2,4
17	23,9	7,6	10,2	3,3	9,6	3,5	13,4	5,3	5,9	2,3
19	21,4	2,6	8,4	2,2	11,4	1,0	10,3	2,6	5,7	2,1
S	25,7	5,2	13,7	3,6	10,7	2,2	10,2	5,6	12,6	3,8
S + 10	26,6	7,0	18,8	3,2	13,8	0,3	12,7	4,2	8,3	4,0
S + 15	13,5	1,4	11,8	8,2	7,2	1,1	7,3	3,0	7,9	0,7
E	14,3	2,5	13,1	6,1	10,6	1,5	11,5	2,3	11,5	2,4

TABELLE IV

P-GLY-DH-Aktivität in µMol/min/gFG

Inkubations-tage	Leber		Niere		S-Muskel		Herz		Gehirn	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
3	1,1	0,1	–	–	–	–	–	–	0,5	0,4
5	4,0	2,1	0,8	0,1	0,8	0,2	0,8	0,2	0,4	0,1
7	12,4	4,5	0,9	0,7	0,8	0,8	0,6	0,5	0,4	0,3
9	19,2	17,1	1,1	0,4	0,8	0,5	0,9	0,5	1,1	0,4
11	34,1	17,2	2,0	0,6	0,9	0,3	1,0	0,3	1,1	0,9
13	33,6	20,5	1,8	0,9	1,0	0,6	1,1	0,6	1,1	0,5
15	34,2	12,1	2,9	1,4	1,3	0,5	2,6	2,1	1,1	0,6
17	22,7	5,6	1,5	0,7	1,1	0,5	1,1	0,8	1,4	0,8
19	24,2	13,9	1,9	1,4	0,9	0,7	1,4	0,5	1,2	0,5
S	26,6	13,4	2,7	1,4	1,2	1,0	1,2	0,6	2,2	1,2
S + 10	15,3	2,4	2,4	0,4	0,8	0,4	0,4	0,4	1,7	1,1
S + 15	15,2	3,7	1,9	0,6	0,7	0,04	0,9	0,3	2,0	0,8
E	25,6	5,2	2,4	2,1	1,8	0,9	1,3	0,5	1,8	0,9

TABELLE V

GAP-DH-Aktivität in μMol/min/gFG

Inkubations-tage	Leber		Niere		S-Muskel		Herz		Gehirn	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
3	14,6	3,3	–	–	15,3	5,7	24,4	4,2	15,0	9,0
5	47,0	9,1	42,6	30,8	31,6	5,1	42,4	6,4	28,2	5,4
7	68,4	53,2	15,4	9,4	13,4	4,5	24,0	6,8	17,7	7,2
9	86,3	25,3	21,8	14,0	13,7	5,7	32,5	10,3	24,5	14,1
11	140	71,7	41,8	7,4	17,2	1,1	31,9	19,6	24,0	16,4
13	142	55,0	37,3	17,1	19,3	7,0	28,5	9,3	24,4	9,7
15	150	49,5	53,9	15,3	20,1	8,8	41,7	14,4	22,8	11,3
17	207	74,8	45,4	18,8	20,1	14,5	46,0	31,2	23,8	10,4
19	128	10,5	39,9	11,3	12,9	7,4	16,6	6,4	23,5	4,6
S	146	39,8	59,1	16,2	3,4	1,8	24,3	17,5	35,6	8,8
S + 10	69,0	36,7	57,5	25,4	7,8	5,4	13,6	3,8	52,6	26,1
S + 15	77,0	19,1	48,1	15,8	16,9	7,1	15,7	4,3	42,0	17,9
E	60,4	27,3	23,3	8,5	29,0	18,3	35,2	11,7	34,3	9,3

TABELLE VI

ENO-Aktivität in μMol/min/gFG

Inkubations-tage	Leber		Niere		S-Muskel		Herz		Gehirn	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
3	3,5	1,6	–	–	3,9	2,2	3,0	2,1	1,8	0,4
5	16,9	5,3	6,5	3,1	4,2	1,2	4,5	1,1	4,6	1,4
7	25,7	11,8	5,3	1,7	3,2	1,1	3,2	0,8	4,4	1,5
9	19,4	10,1	5,5	0,7	2,5	0,9	4,6	1,3	4,6	1,2
11	20,0	5,1	11,4	6,3	3,2	1,2	5,7	2,6	5,0	2,0
13	44,2	20,3	9,8	4,5	2,2	1,1	5,2	1,9	4,8	2,0
15	46,7	26,6	10,6	4,5	2,7	0,9	7,5	2,5	4,3	1,9
17	32,3	14,1	9,3	4,4	3,1	1,8	7,3	2,7	4,5	1,4
19	27,2	11,3	8,6	1,0	3,2	0,9	4,3	2,7	2,8	0,8
S	99,3	2,9	2,6	0,8	1,2	0,8	1,9	0,6	1,8	0,8
S + 10	14,3	6,1	3,7	1,3	1,3	0,8	0,8	0,3	1,7	0,8
S + 15	30,9	10,1	5,6	1,5	2,8	0,9	2,3	1,1	8,6	1,4
E	11,1	6,6	8,9	6,1	13,9	8,2	6,3	3,0	5,0	2,1

TABELLE VII

P-GLY-K-Aktivität in μMol/min/gFG

Inkubationstage	Leber		Niere		S-Muskel		Herz		Gehirn	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
13	53,4	–	11,6	–	5,2	–	8,3	–	15,5	–
15	113,1	–	39,6	–	8,0	–	24,1	–	20,0	–
17	68,9	–	23,5	–	8,1	–	15,3	–	10,0	–
19	59,1	–	27,1	–	19,3	–	16,0	–	15,8	–
S	73,1	–	46,2	–	22,9	–	20,0	–	19,5	–
S + 10	80,7	–	58,0	–	28,8	–	24,2	–	27,8	–
S + 15	73,7	–	79,1	–	47,3	–	36,0	–	27,9	–
E	77,0	–	89,2	–	56,1	–	36,4	–	46,3	–

TABELLE VIII

PYR-K-Aktivität in μMol/min/gFG

Inkubationstage	Leber		Niere		S-Muskel		Herz		Gehirn	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
3	26,6	4,7	–	–	36,5	26,3	30,7	3,7	27,0	3,6
5	27,7	19,3	38,5	17,7	33,2	6,0	26,4	13,9	38,5	7,1
7	14,0	8,6	16,4	4,6	17,9	9,5	35,9	5,8	41,4	6,5
9	12,3	5,9	14,5	5,2	12,1	4,4	27,4	12,4	38,3	15,1
11	12,8	4,5	16,3	5,0	14,5	1,8	33,1	16,0	36,8	9,1
13	11,9	6,7	15,2	7,9	14,4	2,8	24,4	7,5	29,3	4,7
15	11,9	8,2	13,7	4,7	14,1	4,2	23,3	6,3	20,6	5,6
17	12,8	7,5	15,5	3,9	18,9	10,2	24,9	7,6	23,7	5,6
19	7,8	2,6	12,5	3,5	9,3	4,7	11,5	4,8	18,2	6,2
S	5,7	1,6	16,8	3,7	2,7	1,8	9,3	5,9	31,2	18,3
S + 10	–	–	–	–	7,1	–	10,6	–	41,0	–
S + 15	2,6	0,8	6,5	2,5	3,9	2,7	1,6	1,1	54,0	16,0
E	9,1	3,8	27,8	11,9	36,4	26,9	15,8	5,7	62,5	13,7

TABELLE IX

HEX-Aktivität in μMol/min/gFG

Inkubationstage	Leber		Niere		S-Muskel		Herz		Gehirn	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
3	17,3	10,0	–	–	14,3	7,2	10,7	2,7	6,1	2,8
5	14,3	4,1	10,2	2,6	5,1	2,0	12,3	2,0	5,7	2,9
7	8,9	1,7	4,9	1,9	3,3	1,5	6,6	3,2	4,1	1,0
9	11,6	5,8	8,0	3,6	3,3	2,6	8,3	0,4	4,6	2,4
11	20,1	18,4	11,3	3,0	3,2	1,2	10,1	3,4	4,9	2,2
13	18,9	10,9	12,3	5,3	4,1	2,3	9,6	4,0	5,5	1,9
15	17,8	8,3	13,6	9,0	5,5	2,3	11,3	3,1	6,2	1,8
17	17,2	5,0	7,2	2,2	7,9	2,5	12,8	5,0	8,1	2,6
19	17,4	3,7	6,8	2,0	10,7	3,7	10,0	3,8	10,6	3,3
S	10,9	5,9	3,9	1,0	2,5	0,9	3,2	2,0	8,9	2,8
S + 10	10,7	7,6	5,4	0,8	3,6	1,3	3,1	0,8	9,1	0,3
S + 15	47,5	19,3	14,5	5,8	4,9	2,5	7,2	2,0	18,9	7,4
E	17,4	–	17,5	–	11,0	–	8,2	–	43,3	–

TABELLE X

F-1,6-P-A-Aktivität in μMol/min/gFG

Inkubationstage	Leber		Niere		S-Muskel		Herz		Gehirn	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
3	1,2	0,3	–	–	1,5	0,2	1,7	1,2	1,6	0,8
5	2,8	1,3	1,8	1,4	1,7	0,4	2,7	1,7	2,0	0,4
7	3,5	2,8	1,5	0,1	1,2	0,4	2,2	0,4	1,4	0,3
9	4,8	3,4	1,2	0,3	1,1	0,3	3,3	1,5	1,5	0,3
11	6,2	2,5	1,1	0,5	1,3	0,7	4,1	2,4	1,6	0,6
13	6,7	4,4	1,3	0,5	0,9	0,3	3,2	2,2	1,2	0,4
15	5,8	1,8	1,7	0,8	1,2	0,3	3,1	0,4	1,5	0,1
17	5,2	1,6	1,3	0,5	1,9	1,3	3,1	1,0	1,7	0,1
19	6,9	2,8	1,9	0,7	4,1	0,8	3,6	0,7	2,3	0,8
S	2,1	0,4	1,8	0,5	4,3	1,7	5,5	0,7	3,5	0,5
S + 10	3,3	0,8	2,4	0,2	4,4	0,4	4,2	0,8	4,1	0,4
S + 15	3,2	0,6	2,5	0,9	7,7	3,9	2,9	0,4	4,3	0,5
E	3,1	2,5	2,2	0,8	19,2	7,4	3,7	1,1	4,1	0,8

TABELLE XI

F-6-P-K-Aktivität in μMol/min/gFG

Inkubations-tage	Leber		Niere		S-Muskel		Herz		Gehirn	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
3	1,7	0,5	–	–	2,1	0,1	2,4	1,1	2,2	0,8
5	1,9	0,6	1,4	0,4	1,3	0,2	1,6	0,4	1,3	0,4
7	1,4	0,2	1,5	0,3	1,2	0,4	1,3	0,3	0,9	0,5
9	1,1	0,3	0,8	0,6	0,6	0,4	0,6	0,1	0,6	0,3
11	1,5	1,2	0,9	0,6	0,7	0,4	0,8	0,4	1,0	0,8
13	2,5	2,0	1,1	0,6	1,1	0,7	1,1	0,7	1,3	0,7
15	1,6	0,7	1,4	0,8	1,3	0,8	1,1	0,6	1,1	0,8
17	2,3	1,8	1,0	0,6	0,7	0,4	1,2	0,8	0,9	0,4
19	2,2	0,3	1,9	1,1	1,1	0,9	1,5	1,5	1,5	1,3
S	2,6	0,4	1,8	0,7	1,8	1,1	1,7	0,6	1,8	0,7
S + 10	5,0	2,3	2,6	1,9	1,3	0,4	1,2	0,8	1,2	0,4
S + 15	3,2	0,6	4,0	1,4	1,3	0,8	0,9	0,5	1,2	0,3
E	1,8	–	2,0	–	4,9	–	–	–	–	–

TABELLE XII

G-6-P-DH-Aktivität in μMol/min/gFG

Inkubationstage	Leber		Niere		Gehirn	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
3	0,4	0,4	–	–	0,1	0,3
5	0,2	0,3	0,3	0,1	0,5	0,3
7	0,4	0,4	0,3	0,2	0,1	0,3
7	0,9	0,8	0,5	0,4	0,3	0,3
11	0,4	0,3	0,6	0,4	0,2	0,2
13	0,2	0,3	0,5	0,8	0,2	0,3
15	0,5	0,8	0,4	0,2	0,1	0,3
17	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3
19	0,2	0,3	0,7	0,5	0,3	0,4
S	0,1	0,1	0,5	0,2	0,3	0,2
S + 10	0,3	0,1	0,3	0,0	0,5	0,3
S + 15	0,6	0,6	0,4	0,5	0,1	0,3
E	1,4	0,7	2,8	2,1	0,7	0,4

TABELLE XIII

KK-Aktivität in µMol/min/gFG

Inkubations-tage	Leber		Niere		S-Muskel		Herz		Gehirn	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
3	–	–	–	–	–	–	–	–	77	24,7
5	–	–	–	–	25,5	24,8	76	30,7	200	39,0
7	–	–	–	–	44	14,6	161	138	247	185
9	–	–	–	–	37	4,1	167	82,5	249	59,8
11	–	–	–	–	126	51,2	197	64,9	226	37,3
13	–	–	–	–	110	20,8	314	151	246	38,7
15	–	–	–	–	94	27,5	288	74,5	198	48,5
17	–	–	–	–	107	42,3	331	293	239	75,4
19	–	–	–	–	297	27,6	294	189	278	–
S +	–	–	–	–	309	125	319	90,0	274	181
S + 10	–	–	–	–	286	67,5	301	17,9	249	72,8
S + 15	–	–	–	–	487	153	700	114	526	214
E	–	–	–	–	2081	420	546	–	312	82,7

TABELLE XIV

GOT-Aktivität in µMol/min/gFG

Inkubations-tage	Leber		Niere		S-Muskel		Herz		Gehirn	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
3	1,4	0,5	–	–	1,7	2,3	2,5	1,3	1,2	1,0
5	7,4	3,5	2,3	1,5	1,7	0,3	4,5	1,2	1,6	0,3
7	11,2	2,9	3,9	0,3	1,7	0,3	4,1	0,5	1,3	0,5
9	13,9	3,2	5,1	1,5	1,0	0,4	5,0	0,7	2,1	0,5
11	25,0	9,1	9,5	1,6	1,6	0,4	6,3	2,0	1,6	0,8
13	24,3	13,9	8,5	2,3	1,2	0,5	7,3	3,3	2,0	0,9
15	21,9	11,7	9,2	3,1	1,5	0,9	8,9	1,6	2,3	1,3
17	18,1	5,3	8,6	2,3	6,0	3,5	11,0	2,3	3,6	1,0
19	18,2	8,9	10,4	4,0	8,0	1,4	13,5	4,0	5,8	4,3
S	25,5	9,3	9,2	2,4	7,6	3,4	17,3	5,7	7,6	1,8
S + 10	23,3	1,0	23,6	4,4	19,5	0,7	23,8	3,8	9,7	2,4
S + 15	29,0	6,6	22,8	7,2	16,5	2,5	25,0	4,2	16,3	8,1
E	15,3	3,4	15,5	1,8	6,4	3,3	21,6	8,3	12,1	1,9

TABELLE XV

IC-DH-Aktivität in μMol/min/gFG

Inkubations-tage	Leber		Niere		S-Muskel		Herz		Gehirn	
	$\bar{x}$	±r	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
3	0,3	0,3	–	–	0,2	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4
5	1,2	0,3	0,8	0,7	–	–	1,1	0,4	0,3	0,3
7	1,5	0,3	1,0	0,4	0,4	0,3	0,7	0,6	0,7	0,5
9	2,1	0,6	1,0	0,4	0,1	0,2	0,7	0,5	0,7	0,3
11	5,4	2,3	3,0	1,4	0,4	0,3	1,0	0,4	1,1	1,0
13	7,2	1,9	2,6	1,0	0,4	0,3	0,9	0,3	0,9	0,5
15	9,3	4,3	3,4	1,0	0,2	0,3	1,1	0,7	0,9	0,3
17	9,1	3,9	2,4	0,8	0,2	0,3	1,1	0,7	0,9	0,3
19	9,4	2,0	2,7	0,3	0,1	0,3	0,9	0,5	2,4	1,5
S	11,9	5,7	3,4	0,9	0,3	0,6	1,5	o,5	1,9	0,4
S + 10	15,8	4,4	6,4	1,1	0,9	1,5	4,8	2,0	1,4	0,4
S + 15	11,5	1,7	4,6	0,9	0,8	0,7	4,7	2,3	1,0	0,6
E	7,2	2,3	5,7	1,8	–	–	7,6	2,9	1,0	0,2

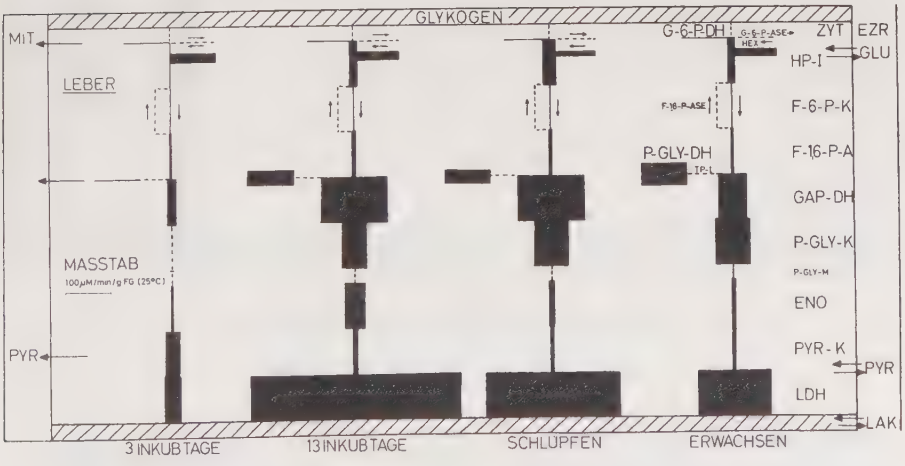

Abb. 6. Enzymverteilungsmuster in der Leber.

Fig. 6. Pattern of enzymes in liver.

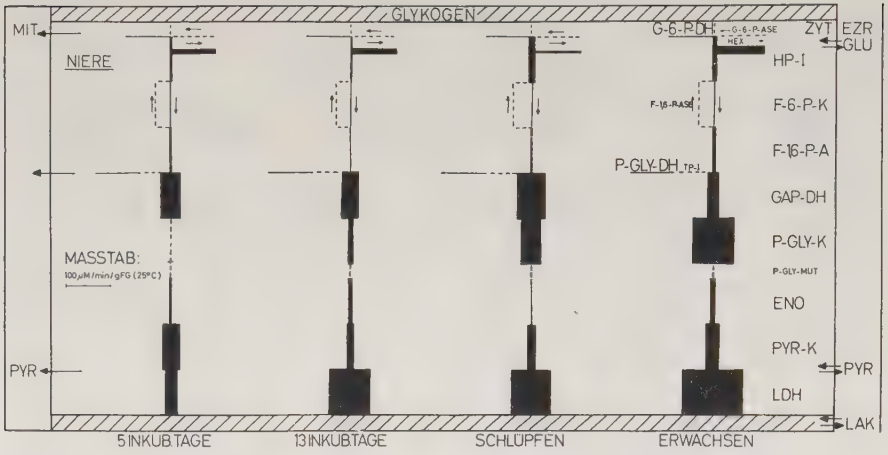

Abb. 7. Enzymverteilungsmuster in der Niere.

Fig. 7. Pattern of enzymes in kidney.

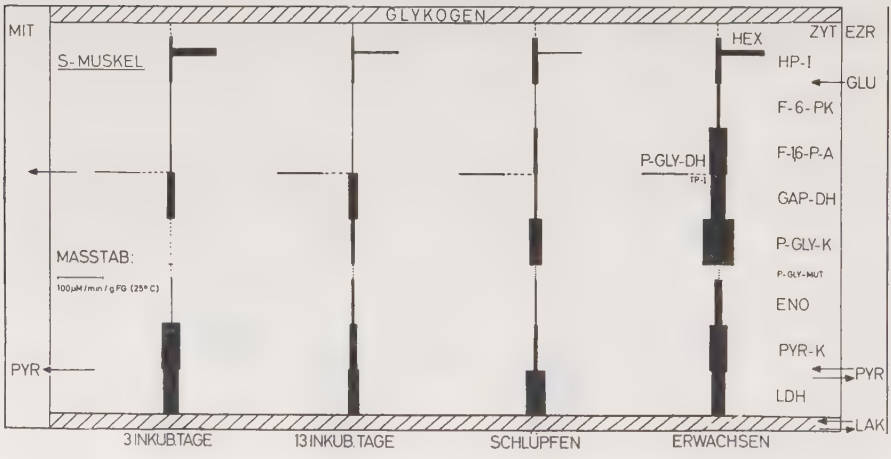

Abb. 8. Enzymverteilungsmuster im S-Muskel.

Fig. 8. Pattern of enzymes in s-muscle.

Die Ursachen der technisch bedingten Streuung können vielfältig sein. In Frage kommen vor allem die unterschiedliche Reinheit der in den Testlösungen verwendeten Enzyme und Koenzyme. So kann z. B. nach relativ kurzer Zeit das gelöste $NADH_2$ in ein, das gleiche Ab-

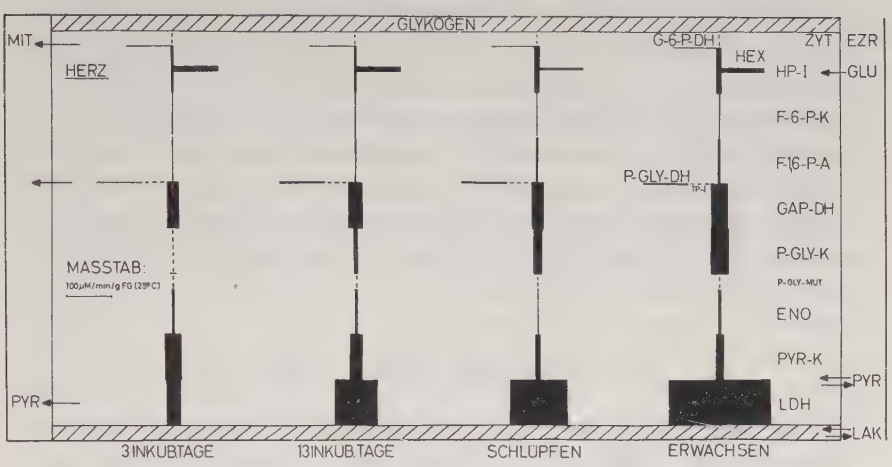

Abb. 9. Enzymverteilungsmuster im Herz.

Fig. 9. Pattern of enzymes in heart.

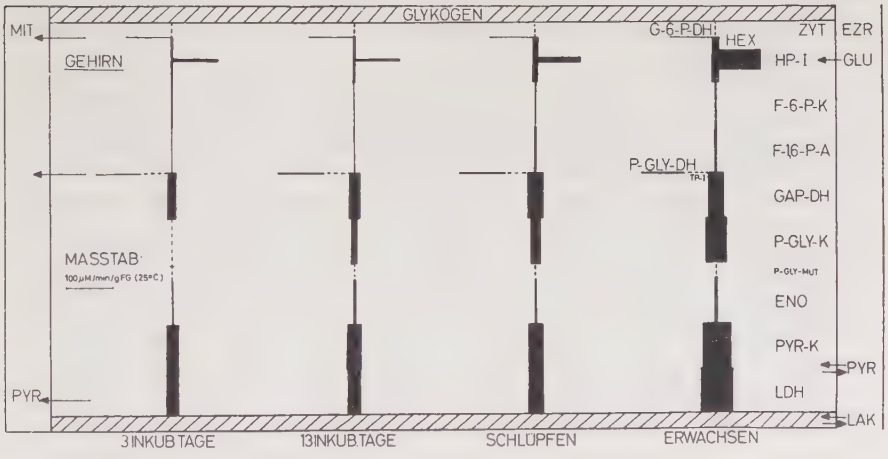

Abb. 10. Enzymverteilungsmuster im Gehirn.

Fig. 10. Pattern of enzymes in brain.

sorptionsmaximum aufweisendes, aber inaktives Isomeres übergehen. Ein Vergleich mit den Resultaten, die für einige wenige Enzyme beim Hühnerembryo von anderen Autoren ermittelt worden sind, ergibt Unterschiede, die innerhalb der Größenordnung einer Zehnerpotenz

liegen können. Dies stimmt mit den von *Delbrück et al.* [13] zusammengestellten Resultaten verschiedener Autoren überein, und dürfte auf Unterschiede in der Versuchsanordnung und auf eine verschiedene Bereitung des Untersuchungsmateriales zurückzuführen sein. Man wird daher Übereinstimmungen von Labor zu Labor, die innerhalb der gleichen Zehnerpotenz liegen, als befriedigend gelten lassen. Daß biologische Unterschiede dabei die Hauptrolle spielen, geht aus der Beobachtung hervor, daß Serumanalysen mit denselben Methoden eine viel kleinere Streuung aufweisen.

Das Verhalten der einzelnen Organe

Eine Betrachtung des Verhaltens der einzelnen Enzyme bei den verschiedenen Organen zeigt, daß die Aussagen über Enzymaktivitäten im Totalembryo nur unter Vorbehalten interpretiert werden können. Bereits am 3. e-Tag (Embryonaltag) sind eindeutige Organunterschiede in bezug auf die Enzymaktivitäten festzustellen. *Mahler et al.* [32], *Moog* [33], *Solomon* [52, 53] und *Levy et al.* [27] weisen nach Untersuchung verschiedener Enzyme darauf hin, daß auch beim Totalembryo der 3. und 4. e-Tag in bezug auf die Entwicklung kritisch sein müssen.

Leber: Erst am 15. e-Tag erscheint das morphologisch typische Bild der erwachsenen Leber. Dies entspricht den Resultaten von *Kingsbury et al.* [23]. *Solomon* [53] vermutet auf Grund histo-chemischer Betrachtungen, daß die Leber um den 15. e-Tag die Adultform erreicht. *Lee* [25] zeigte, daß der Glykogengehalt der Leber gegen Ende der Phase, in welcher wir die höchste LDH-Aktivität messen konnten, ein Maximum erreicht. Dies stimmt wiederum mit den Ergebnissen von *Needham* [35] überein, der einen starken Glykogenanstieg im Gesamtembryo vom 15. e-Tag an feststellen konnte.

Untersuchungen über die Ontogenese des Stoffwechsels liegen von verschiedenen Autoren vor. *Pertseva* [38] bestimmte die Laktatmenge in der embryonalen Hühnerleber und fand ein Maximum zwischen dem 9. und 11. e-Tag. Auch die LDH-Aktivitätsmessungen von *Solomon* [52, 53] und *Mahler et al.* [32] ergaben maximale Enzymaktivitäten zwischen dem 11. und 16. e-Tag. *Rinaudo* [45] fand bei Untersuchungen der Glykogenese in der embryonalen Hühnerleber Aktivitätsmaxima der ENO, F-1,6-P-A, HP-I zwischen dem 12. und 18. e-Tag und kam zum Schluß, daß die Glykogenese aus Pyruvat vollumfänglich als Umkehrung der Glykolyse bereits früh verwirklicht sei. *Bot et al.* [5] beobachten eine relativ hohe Phosphorylase, Phosphoglukomutase- und HP-I-Aktivität in der Leber am 17. e-Tag. Sie schließen daraus, daß im Vogelembryo, im Gegensatz zum Säugerembryo, in der Leber sehr früh ein voller Glykogen- und Glukosestoffwechsel stattfindet. Die Untersuchungen von *Kilsheimer et al.* [22] über die Glukoseproduktion im Embryo zeigen, daß die G-6-Pase bereits nach sechzig Stunden Inkubationszeit nachweisbar ist. Ihre Aktivität

nimmt proportional zum Wachstum der Leber zu. Studien über die CO_2-Inkorporation zeigen ähnliche Resultate. Das Organ ist damit zur Glykogenolyse und Glukoneogenese befähigt.

Unsere eigenen Untersuchungen zeigen bei der Leber für die Mehrzahl der Enzyme die höchsten Aktivitäten. Diese erreichen meist kurze Zeit nach Bebrütungsbeginn Werte, die nach dem Schlüpfen bis ins Adultstadium nicht mehr beobachtet werden können (LDH, GAP-DH, P–GLY–K, P-GLY-DH, ENO, HEX, GOT). Die Vermutung, daß in der frühembryonalen Leber andere Funktionen ausgeübt werden als im erwachsenen Organ, ist naheliegend. Die eigenen Untersuchungen stützen, vor allem wenn man das abweichende Verhalten der PYR-K berücksichtigt, die These von einer rein *degradierenden* Glykolyse im frühembryonalen Zustand dieses Organes. Die hohe PYR-K-Aktivität, bei teilweise sehr niedrigen Aktivitäten der übrigen glykolytischen Enzyme, weist auf einen vom adulten Glykolysetyp abweichenden Stoffwechsel hin. Bereits *1858* hat *C. Bernard* [2] vermutet, daß die Leber im Hühnerembryo in bezug auf den Kohlenhydratstoffwechsel erst spät ihre Adult-Funktion aufnimmt und die Glykogensynthese durchführt. Zu ähnlicher Erkenntnis kamen eine Reihe von Autoren auf Grund von ganz andersartigen Beobachtungen [17, 21, 35, 41, 49, 56]. In bezug auf die beiden alternativen Abbauwege der Kohlenhydrate, den Pentosezyklus und den Trikarbonsäurezyklus zeigt die Leber keinerlei Unterschiede gegenüber den anderen Organen. Eine meßbare G-6-P-DH-Aktivität ist nicht vorhanden.

Niere: Bei der Niere liegt, morphologisch klar erkennbar, keine Organkontinuität vor. Es folgen sich drei Organe im Laufe der embryonalen Entwicklung, die sich in der Ausübung der Nierenfunktion ablösen: Pronephros, Mesonephros, Metanephros. Dabei hat das Pronephros, welches beim Hühnerembryo nur ein sehr rudimentäres Organ ohne eigentliche exkretorische Funktion darstellt [28], schon deshalb keinen Einfluß auf unsere Aktivitätsuntersuchungen, weil es nach 48 Stunden Inkubation bereits wieder degeneriert ist. Die Ablösung vom Mesonephros durch das Metanephros geht fließend vor sich.

Die Ablösung der Organe spiegelt sich im Enzymmuster. Beim Übergang zur endgültigen Niere ist fast regelmäßig ein Aktivitätsanstieg der Enzyme zu einem Plateau um den 11. e-Tag zu beobachten, das bis zum Schlüpfen erhalten bleibt oder wieder leicht abfällt. Daß sich gerade am 11. e-Tag in bezug auf die Nierenfunktion ein kritischer Punkt befindet, lassen auch die Beobachtungen der plötzlichen Akkumulation von Harnsäure [48] vermuten.

Skelettmuskel: Im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Organen hat der Skelettmuskel während des größten Teiles der Embryonalentwicklung keine funktionellen Aufgaben zu erfüllen. Damit kann er als Idealfall der Aufgabe dienen, zu zeigen, wie sich das Enzymmuster in einem Gewebe entwickelt, das nur mit der Vergrößerung der eigenen Zellmasse und der Differenzierung seiner Organellen zu tun hat. Beim Skelettmuskel des Hühnerembryos wurde die gegenseitige Abhängigkeit von Proliferation und Differenzierung untersucht [18, 19, 20], wobei sich eindeutig ein bestimmter Ablösungsvorgang dieser beiden Phasen zeigt. *Pertseva* [38] beobachtet sehr geringe Laktatkonzentrationen bis zum 17. e-Tag und dann einen raschen Anstieg dieses Metaboliten auf das zehnfache beim Schlüpfen. Ergänzend sei erwähnt, daß *Rashba* [42] bei der Untersuchung der Nackenmuskulatur des Embryos eine Zunahme von Laktat schon in einem früheren Zeitpunkt messen konnte. Dies ist offensichtlich auf die vermehrten Muskelkontraktionen in diesem Körpergebiet zurückzuführen. *Solomon* [53] fand bis zum 3. p. e-Tag noch keine LDH-Aktivitätszunahme. Erst im Adultstadium erfolgt eine Erhöhung auf das dreifache.

Im Vergleich zu diesen Ergebnissen zeigen die von uns ermittelten Enzymaktivitäten der Glykolyse übereinstimmend durchwegs sehr niedrige Werte. Diese beginnen erst kurz vor dem Schlüpfen, also mit zunehmender Muskelbewegung und damit gesteigerter Energieproduktion anzusteigen und erreichen nach dem Schlüpfen um den 15. p. e-Tag den Spiegel der Adultwerte. Betrachtet man im Gegensatz zu dieser Entwicklung der glykolytischen Enzyme, jene der funktions- und organspezifischen KK, so ist der Unterschied klar ersichtlich. Am 3. e-Tag ist noch keine Aktivität vorhanden, es liegt auch kein differenziertes Muskelgewebe vor. Die Aktivität steigt parallel zur Zunahme der Eiweißmenge, wie Vergleiche mit Messungen von *Leslie et al.* [26] über die Zunahme sowohl der Zellmasse als auch des Protein-N zeigen. Um diese Verhaltensweise der KK im Gegensatz zur Glykolyse verstehen zu können, muß angenommen werden, daß für die Aufrechterhaltung der notwendigsten Lebensvorgänge die unmittelbare Energiequelle, das ATP frühembryonal genügt. Die Bedeutung des Kreatinkinase- und Myokinasesystems liegt darin, daß dieses als Speicher von energiereichem Phosphat bei plötzlichem großem Energiebedarf zur Verfügung steht. Eine solche Lage ist aber erst zu erwarten, wenn es zu willkürlichen Muskelkontraktionen kommt.

Herz: Die histologischen Präparate des Herzmuskels zeigen vom 3. e-Tag an eine kontinuierliche Entwicklung des Gewebes. Die Differenzierung ist früh weitgehend abgeschlossen und während der Untersuchungsperiode spielt sich vorwiegend eine Massenzunahme ab. Bei *Solomon* [53] zeigt die LDH-Aktivität in der zweiten Hälfte der Embryonalentwicklung ein erstes Maximum und fällt wieder ab.

Bei unseren Messungen finden wir in der mittleren Embryonalzeit

recht hohe Aktivitäten, die wesentlich von jenen im Skelettmuskel abweichen. Im Gegensatz zu *Solomon* [53] steigen die LDH-Werte gleichmäßig zu hohen Adultwerten an. Betrachtet man dazu die extrem tiefen Werte der PYR-K am 15. p. e-Tag, so erweckt dies wieder den Eindruck, daß sich der Übergang von der pränatalen zur postnatalen Glykolyse erst nach dem Schlüpfen abspielt. In weit schnellerer Weise als im Skelettmuskel steigt im Herzmuskel die KK-Aktivität zu einem ersten Plateau um den 13. e-Tag an. Erst um den 10. p. e-Tag beginnt ein neuerlicher Anstieg zu Adultwerten, die etwa einen Drittel der entsprechenden Werte beim Skelettmuskel ausmachen. Dies hängt wohl mit der verschiedenen funktionellen Beanspruchung zusammen. Im embryonalen Zustand ist durch die wesentlich höhere Herzmuskeltätigkeit auch eine größere Beanspruchung der KK anzunehmen. Die Aktivitätsschwankungen innerhalb des glykolytischen Enzymmusters während der Ontogenese dürften Ausdruck des wechselnden Substratangebotes sein. Es ist bekannt, daß gerade der Herzmuskel einen großen Teil seiner Energieproduktion nicht aus der Verbrennung von Kohlenhydraten, sondern aus der Verwertung von Fettsäuren und Eiweißabbauprodukten bezieht. Daher ist die Vermutung berechtigt, daß die Aktivitätsabnahme nach der Geburt und der folgende neuerliche Anstieg zu den Adultwerten das Einspielen eines neuen Verhältnisses zwischen Glykolyse und Atmung aus-drückt. Dies geht auch aus der nach der Geburt rasch verlorengehenden relativen Anoxie-Resistenz hervor. Der O_2-Verbrauch in der Zeit des Schlüpfens steigt pro g/FG/h von 0,6 cm^3 am letzten e-Tag auf 3 cm^3 am 3. e-Tag [31]. Der deutliche Aktivitätsanstieg der IC-DH vom Tag des Schlüpfens an und der kontinuierliche Anstieg der GOT bis zum Erreichen der Adultwerte am 15. p. e-Tag verlaufen parallel mit der Ausbildung der Mitochondrien, in denen die Enzyme der Atmung lokalisiert sind.

Gehirn: Bei der Interpretation der glykolytischen Enzymaktivitäten im Gehirn muß eine Einschränkung gemacht werden. In diesem Organ liegen ein Teil der glykolytischen Enzyme im Adult-Zustand nicht im C-Raum, sondern intramitochondrial.

Für eine beschränkte Glykolyse im Gehirn des Embryos sprechen die von *Solomon* [53] gefundenen Werte für die LDH-Aktivität, die dort von allen gemessenen Organen am geringsten ist und erst nach dem Schlüpfen zu steigen beginnt. *Davidson* [12] gelangt nach der Aktivitätsmessung der F-1,6-P-A, die während der ganzen Embryonalperiode im Gehirn gleich gering zu sein schien, zum Schluß, daß die Glykolyse nicht die Hauptenergiequelle sein kann, sondern der Pentosezyklus. Nach der, bei der Embryonalentwicklung allerdings kaum vertretbaren Anschauung

vom kraniokaudalen Gefälle, sollte im Gehirn schon zu Beginn der Inkubation eine größere Differenzierung vorliegen als in den anderen Organen. Dies ist aber nicht der Fall.

Bei den eigenen Untersuchungen findet sich mit Ausnahme der KK und PYR-K bei keinem Enzym ein Hinweis auf einen höheren Differenzierungsgrad. Dieser ist im Gegensatz zu allen Organen während der Embryonalperiode nach den erhaltenen Resultaten im Gehirn am wenigsten fortgeschritten. Diese Beobachtung zeigt, daß die enzymatischen Befunde nicht einfach den morphologischen parallel gehen. Das erstaunliche Verhalten der PYR-K, die am 3. e-Tag im Gegensatz zu den vier andern Organen eine Aktivitätszunahme zeigt und sehr rasch hohe Adultwerte erreicht, muß ein Hinweis sein, daß im Gehirn im embryonalen Zustand, wie von anderen Autoren auch vermutet, eine modifizierte Glykolyse vorhanden ist. Die bereits am 3. e-Tag sehr hohe KK-Aktivität im Gehirn ist auffallend und wahrscheinlich funktionell bedeutungsvoll. Die hohen KK-Konzentrationen sind eine Eigentümlichkeit des ektodermalen Gewebes. Gerade im Gehirn, wo bereits sehr früh energieverbrauchende Leistungen gefordert werden, scheint das Phosphokreatin als Energiereserve eine hervorragende Rolle zu spielen.

Diskussion

Wachstum und Enzymentwicklung. Die Ontogenese der Enzyme kann unter verschiedenen Gesichtspunkten betrachtet werden: Entwicklung, Wachstum, Differenzierung, Spezialisierung. Diese Aspekte sind innerlich alle verknüpft, doch ist es unumgänglich, die Begriffe von Wachstum einerseits und Differenzierung andererseits, wie sie etwa von *v. Bertalanffy* [3], *Weiss* [61] und *Linzbach* [29] definiert wurden, scharf auseinanderzuhalten. Im Gegensatz zu älteren Arbeiten wurden die Enzyme nicht im Totalembryo, sondern in isolierten Organen bestimmt. Daß die dabei erhaltenen Werte wesentlich von denjenigen im gesamten Embryo abweichen, ist bereits aus dem vorangehenden Abschnitt hervorgegangen.

Unter Massenzunahme ist die Vermehrung der Enzymmoleküle pro Organ zu verstehen. In den durchgeführten Untersuchungen wurden spezifische Enzymaktivitäten gemessen. Diese erlauben keine Aussage über die Größe der von jedem Enzym vorhandenen Menge. Da es nicht möglich war, die Gewichte der einzelnen Organe zu bestimmen, wurde zur Berechnung der Enzymmenge ganzer Organe auf die sehr exakten Messungen von *Schmalhausen* [47] zurückgegriffen.

Seine Wachstumskurve für den Gesamtembryo stimmt mit der von uns ermittelten so gut überein, daß ein solches Vorgehen gerechtfertigt ist. Die Beziehung zwischen relativem Wachstum eines Systems und Veränderung eines Teiles dieses Systems (Enzymaktivität) kommt am deutlichsten in der Allometrie zum Ausdruck. Damit kann eine Aussage über das relative Wachstum (Anwachsen eines Systems mit einer höheren oder tieferen Zuwachsrate gegenüber einem Teil dieses Systems) gemacht werden. Dieses allometrische Verhältnis ge-

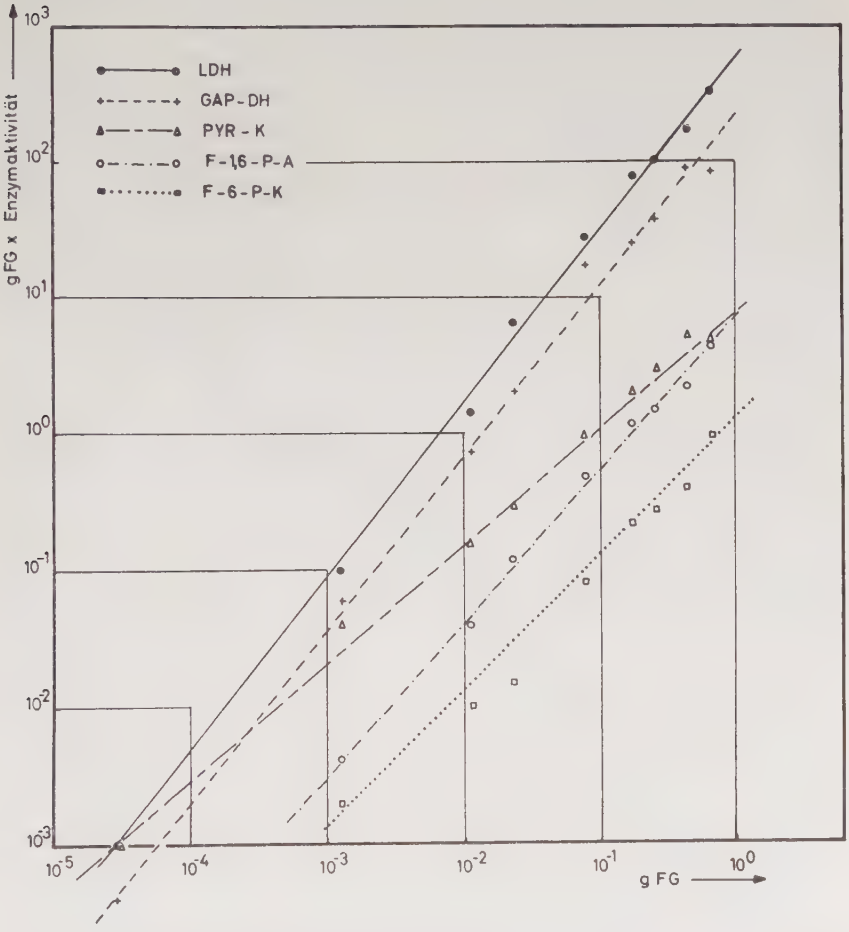

Abb. 11. Allometrische Darstellung der Entwicklung von 5 Enzymen im Vergleich zum Leberwachstum.

Fig. 11. Allometric plots of the development of 5 enzymes in relation to the growth of the liver.

nügt der Gleichung $y = bx^k$, wo y das Maß für das Wachstum eines Teiles, x jenes des entsprechenden ganzen Individuums bedeutet, b und k sind Konstanten. Die allometrische Darstellung, wie sie in Abbildung 11 und 12 benützt wurde, zeigt auffällige Zusammenhänge. Es wird bei allen Enzymen bei dieser Darstellungsweise eine Gerade erhalten. Dies bestätigt die Gültigkeit des allometrischen Gesetzes. Der Nachweis dieser Gültigkeit wurde unseres Wissens bisher noch nie für Enzyme oder andere funktionsspezifische Eiweiße erbracht.

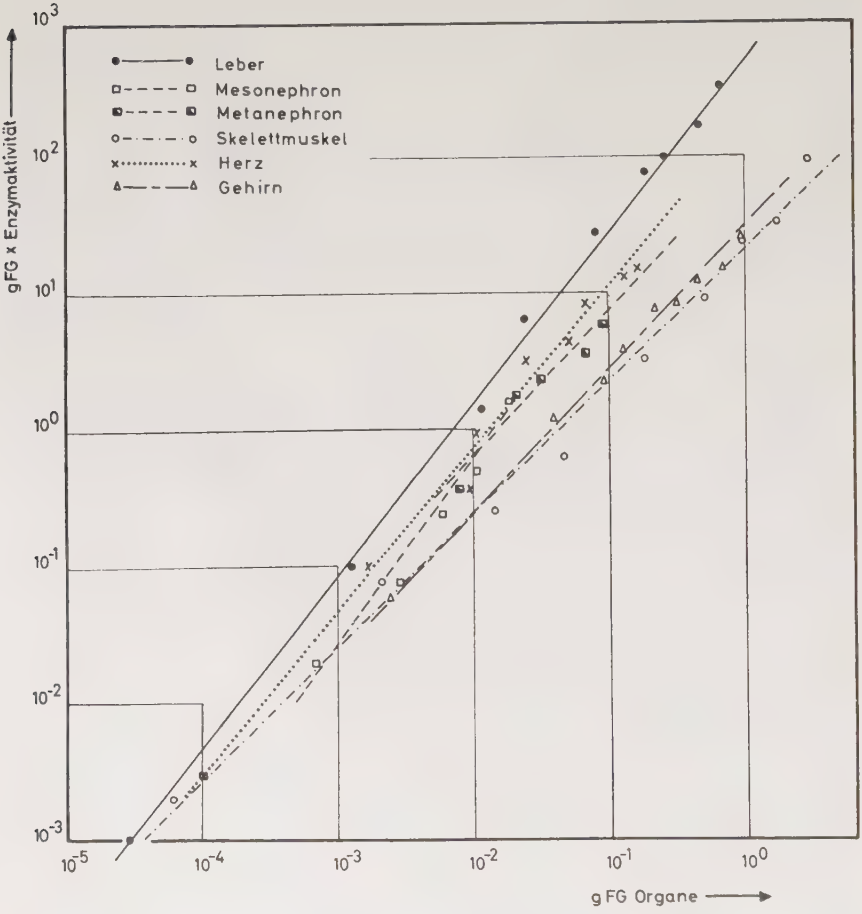

Abb. 12. Allometrische Darstellungen der LDH-Entwicklung bei fünf Organen.

Fig. 12. Allometric plots of the development of LDH in 5 organs.

Aus der verschiedenen Steilheit der Geraden geht hervor, daß sich die einzelnen Organe unterschiedlich verhalten. Während die LDH im Herzmuskel oder in der Leber eine isometrische Kurve ergibt, d. h. Wachstum von Organ und Wachstum der Enzymmenge in direkter linearer Beziehung stehen, ist im Skelettmuskel ein Überwiegen der Enzymsynthese festzustellen. Die Massenzunahme der Enzyme ist somit ein organtypisches Phänomen. Der Vergleich verschiedener Enzyme in einem Organ zeigt ebenfalls Unterschiede. Die PYR-K fällt deutlich aus dem Rahmen der übrigen Enzyme, die alle – ob mit hoher oder sehr niedriger spezifischer Aktivität gemessen – ein gleichartiges relatives Wachstum aufweisen. Die PYR-K-Aktivität allein erfährt in der Ontogenese eine Verminderung. So erscheint die Allometrie besonders geeignet, die Entwicklung von Enzymsystemen zu analysieren. Abweichende Kurven einzelner Enzyme lassen Veränderungen in der Dynamik des Systems vermuten.

Morphologische Differenzierung und Enzymentwicklung. Die Differenzierung charakterisiert die qualitativen Aspekte der Entwicklung. Sie spielt sich gleichzeitig auf verschiedenen Ebenen ab, in Zelle, Gewebe und Organ. Die beobachtete fließende Entwicklung der Enzyme weist darauf hin, daß die biochemische Entwicklung wesentlich kontinuierlicher verläuft, als auf Grund der morphologischen Veränderung zu erwarten wäre. Eine direkte Beziehung zwischen der Gestalt auf mikroskopischer und makromolekularer Ebene scheint nicht vorzuliegen. Betrachtet man die Enzymaktivitäten in den einzelnen Organen, so muß angenommen werden, daß das zytoplasmatische Eiweiß während der Entwicklung sehr großen Veränderungen unterworfen ist. Deshalb ist die Ansicht vom mehr oder weniger homogenen Embryo und der linearen Entwicklung der einzelnen Organe und ihrer Zelltypen unhaltbar.

Funktionelle Differenzierung und Enzymentwicklung. Betrachtet man die funktionelle Differenzierung im Zusammenhang mit der Enzymentwicklung, so darf nicht zu großes Gewicht darauf gelegt werden, daß einzelne Enzyme, z. B. die Cholinesterase, erst dann in Erscheinung treten, wenn sie gebraucht werden. So ist die KK in unseren Untersuchungen bei Inkubationsbeginn im Herzen nicht meßbar, wohl aber im Gehirn. Dies obwohl der Herzmuskel eine funktionelle Aufgabe hat. Damit ist die früher in der Morphologie vertretene Annahme eines kraniokaudalen Gefälles im Embryo auch im enzymatischen Bereich nicht zutreffend. Es zeigt sich bei der Großzahl der Enzyme, daß das Gehirn hinsichtlich des Enzymmusters keinenfalls

weiter fortgeschritten erscheint. Aber auch die Ansicht, daß primär in allen Organen ein weitgehend gleicher Enzymsatz vorhanden sei, da die Organe während der Entwicklungsphase ihre spezifische Funktion noch nicht ausüben, ist nicht haltbar.

Biochemische Differenzierung. Bei der Entwicklung der einzelnen Enzyme sind grundsätzlich drei Möglichkeiten der Steuerung der Synthese zu diskutieren:

1. Jedes Enzym ist in jedem Zelltyp individuell genetisch determiniert, und zwar in bezug auf Beginn als auch auf Größe der Synthese.
2. Funktionsmäßig eng verknüpfte Enzyme sind auch genetisch eng verknüpft, werden parallel synthetisiert und bilden eigentliche Enzymketten.
3. Einzelne Schlüsselenzyme sind präformiert. Weitere abhängige Enzyme werden als Folge eines Substratanstaues im Laufe der Entwicklung gebildet. Man könnte in diesem Falle von Sequenzinduktion durch die Substrate sprechen.

Die zweite Möglichkeit scheint am wahrscheinlichsten, da es sinnvoll scheint, daß solche Enzyme einen gleichen oder sehr naheliegenden Genlocus haben. Auf Grund dieser Ergebnisse muß aber angenommen werden, daß jedes Enzym in jedem Zelltyp individuell genetisch determiniert ist. Anders kann nicht erklärt werden, daß sich funktionell so nahestehende Enzyme wie die PYR-K und LDH nahezu gegensätzlich verhalten. Damit ist die Vorstellung der Enzymontogenese gewaltig erschwert worden, muß doch eine Vielzahl von Genen gefordert werden. Wie ist nun zu erklären, daß jenes Gen, welches für die PYR-K-Synthese verantwortlich ist, in einem Fall, beim Gehirn, dafür sorgt, daß die Enzymaktivität gleich nach Beginn der Embryonalentwicklung ansteigt, bei den anderen Organen aber abfällt? Eine Hypothese wäre, daß es nicht nur eine PYR-K, sondern mehrere zellspezifische PYR-K gäbe. Zur Beantwortung dieser Frage kann die Entdeckung von im chemischen Bau voneinander abweichenden sogenannten *Iso*enzymen weiterhelfen [6, 8, 36, 39, 62]. Weiter wäre die Möglichkeit zu diskutieren, daß das Erfolgsorgan der Genwirkung zuerst einen bestimmten Differenzierungsgrad erreicht haben muß, bevor das Enzym synthetisiert werden kann.

Entwicklungsgeschichtliche Bemerkungen. Die beobachtete Zäsur in der ontogenetischen Enzymentwicklung des Hühnchens um den 13. e-Tag kann auch in einen interessanten entwicklungsgeschichtlichen Rahmen gestellt werden. So hat *Portmann* [40] darauf hingewiesen, daß gerade dieses Stadium dem frühesten Zustand und Zeitpunkt entspricht, in dem wir ausschlüpfende Vögel kennen. In dieser Zeit schlüpfen die Nesthocker mit ihrer intensiven Brutpflege. Es hat sich

nun gezeigt, daß aber auch die für Vögel primäre ontogenetische Entwicklung der Nestflüchter, zu denen das Hühnchen gehört, zwischen 11. und 13. e-Tag ein Stadium erreicht, in dem das Gehirn und die wichtigsten Organe des Stoffwechsels weitgehend differenziert und funktionsfähig sind [15, 54]. Die Brutzeit wird auch bei extremster Verkürzung nicht über diesen Zeitpunkt hinaus vermindert. Der 11.–13. e-Tag scheint in jedem Fall der frühest mögliche Zeitpunkt der Luftexposition des Vogelkeimes zu sein. Das ist aber auch das Stadium, in dem die Enzyme der Energieproduktion ein erstes Maximum erreichen.

Die Glykolyse im Embryo. Übereinstimmend wird angenommen, daß zumindest in den frühen Stadien der Ontogenese die Glykolyse im Zentrum der Energieproduktion steht. Eine Aktivität des einzigen gemessenen Enzyms des Trikarbonsäurezyklus, der IC-DH, ist bis zum 5. e-Tag nicht meßbar. Mitochondrien und damit die Struktur in der die TCA-Enzyme vorkommen, sind noch gar nicht vorhanden.

Beim Betrachten der Enzymaktivitäten ist vor allem der Vergleich zwischen sehr jungen und erwachsenen Stadien von Interesse. Am 3. und 4. e-Tag sind bei den meisten glykolytischen Enzymen kaum Organunterschiede zu beobachten und die Aktivitäten liegen alle in der gleichen Größenordnung, nämlich zwischen 2 und höchstens 20 IU bei der LDH. Es wäre zu erwarten, daß bei gleichbleibender Glykolyse die Relationen zwischen den Enzymen gewahrt bleiben. Dies läßt sich am einfachsten dadurch prüfen, daß die spezifischen Aktivitäten auf *ein* bestimmtes Enzym bezogen werden. Wir wählen als Bezugsenzym die Aldolase. Die Verhältniswerte sind in Tabelle XVI zusammengestellt. Sie zeigen, daß die Relation von PYR-K/F-1,6-PA sich im Laufe der Entwicklung von 25/1 auf 3/1 verschiebt. Das läßt sich kaum mit der Vorstellung in Einklang bringen, daß die Glykolyse im Frühembryo identisch mit jener im adulten Organ ist. In derselben Tabelle finden sich zudem Vergleichswerte, zwischen der von *Needham* [35] einerseits, *Warburg et al.* [59] andererseits gefundenen Laktatproduktion in drei- und fünftägigen Hühnerembryonen und einigen ausgewählten spezifischen Enzymaktivitäten aus unseren Untersuchungen. Auch diese Vergleichswerte müssen zur Erkenntnis führen, daß in der Entwicklung vom embryonalen Organismus zum Adulttier wesentliche Änderungen vorkommen und eine qualitativ verschiedene Glykolyse vorliegt. Die im frühembryonalen Stadium ermittelten glykolytischen Enzymaktivitäten zeigen zum

TABELLE XVI

Glykolysevergleichswerte bei verschiedenem Alter

	3. Embryonaltag		5. Embryonaltag	Adult	
	µMol/min/gFG	E/Ald	µMol/min/gFG	µMol/min/gFG	E/Ald
	Glykolyse$_L^{N_2}$				
Needham	1,36		0,70		
Warburg	1,36 (37° C)		0,30		
	Enzymaktivitäten (Leber)				
LDH	32,8	30	80,9	156,0	50
PYR-K	26,6	*25*	27,7	9,1	*3*
ENO	3,5	3	16,9	11,1	3
GAP-DH	14,6	11	47,0	60,4	20
F-1,6-PA	1,2		2,8	3,1	

Teil Werte, die mit der Laktatproduktion in diesem Zeitpunkt nicht in Übereinstimmung gebracht werden können. *Needham* [35] hat beobachtet, daß eine Blockierung der Glykolyse im embryonalen Gewebe wirkungslos auf die Laktatproduktion blieb und daraus auf das Vorhandensein einer nicht phosphorylierten Glykolyse geschlossen. *Novikoff et al.* [37] versuchten diese Theorie durch die Messung von Metaboliten der Glykolyse zu widerlegen. Gerade diese Metabolitmessungen zeigten aber einige auffallende Befunde, die wohl gegen eine nicht-phosphorylierte Glykolysis sprachen, die Vorstellungen einer atypischen Glykolyse aber nicht widerlegen. Ein Auszug aus

TABELLE XVII

Metabolitmessungen im Hühnerembryo (nach Novikoff)
Werte in µM/100 g

Inkubationstage	3	5½	8	10
Triose-P-ester	291	295	80	86
ADP	2	4	33	47
ATP	98	65	30	72

diesen Metabolitbestimmungen ist in Tabelle XVII dargestellt. Interessant ist dabei vor allem der Rückstau der Triose-P-Ester in den frühen Entwicklungsstadien. Auffallender noch ist die sehr niedrige ADP-Konzentration, die erst am 8. e-Tag auf das zwanzig- bis dreißigfache der vorangehenden Werte steigt. Diese Parallelität zwischen Aktivitätsabnahme der PYR-K und Konzentrationszunahme des Phosphatakzeptors läßt die Vermutung aufkommen, daß der größte Teil des Laktates nicht aus dem Abbau auf dem Embden-Meyerhof-Weg anfällt. Damit wird die Frage aufgeworfen, was als Substrat für eine derart modifizierte Glykolyse dienen könnte. Vor allem Aminosäuren kommen in Frage. Diese liegen beim Huhn sowohl im Eidotter als auch im Eiereiweiß in erheblichen Mengen vor [35]. Es ist bekannt, daß Phospho-enol-pyruvat über Oxalessigsäure gebildet werden kann. Bis heute aber ist unklar, welche Enzyme im tierischen Organismus hier als Katalysatoren wirken könnten. Hohe Transaminasewerte, aber auch hohe Werte von MDH (Malat-Dehydrogenase) und GDH (Glutamat-Dehydrogenase) wurden bei frühen Embryonalstadien beobachtet [52]. So läßt sich ein Weg, wie er schematisch in Abbildung 13 dargestellt ist, diskutieren.

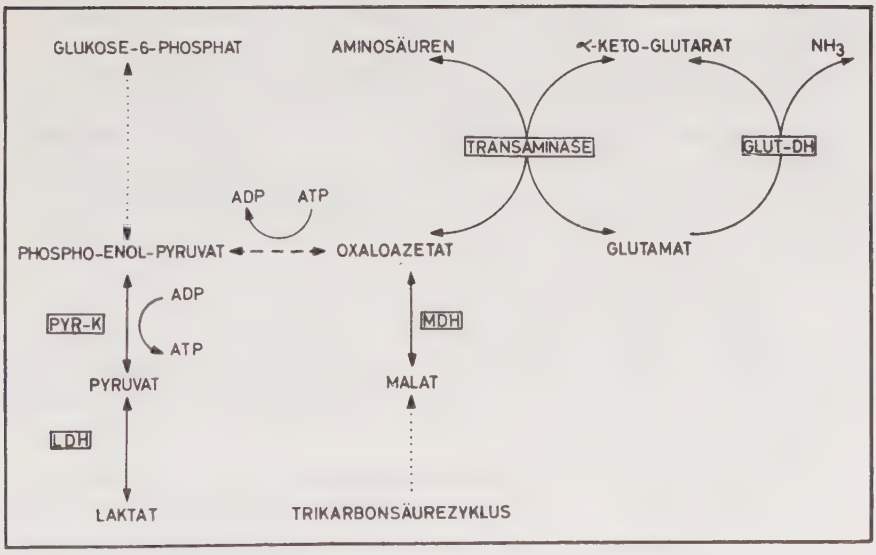

Abb. 13. Schema einer atypischen Glykolyse im Embryonalstadium.

Fig. 13. Postulated atypical glycolysis in early embryonic stages.

Die glykolytischen Enzymverteilungsmuster. Um die Wirksamkeit der glykolytischen Enzyme in ihrer Gesamtheit, sowohl bei verschiedenen Entwicklungsstadien, als auch vergleichend bei den fünf Organen zu untersuchen, wurden die Enzymverteilungsmuster der Glykolyse aufgestellt (Abb. 6–10). Unter den Organen sind 2 Typen von Enzymmustern zu unterscheiden. Bei Leber und Niere verläuft die Glykolyse in beiden Richtungen, Glukose-6-Phosphat kann aus Laktat resynthetisiert werden. Beim Skelettmuskel, Herz und Gehirn, die über keine Phosphatester -Hydrolasen verfügen, wird ausschließlich Laktat gebildet.

Aus dem Nebeneinander von vier Entwicklungsstadien zeigen sich qualitative und quantitative Veränderungen im Enzymmuster wie sie bei Gewebe, das sich noch in ständigem Wachstum und funktioneller Differenzierung befindet, zu erwarten sind. Hat man in erwachsenem Zustand die qualitative Unterscheidung zwischen Organen, die eine rein degradierende Glykolyse zeigen und solchen, die auch Glykogenese aus Laktat durchzuführen vermögen, zu machen, so wurde bereits oben die Hypothese einer während der Embryonalentwicklung rein degradierenden Glykolyse auch in der Leber und der Niere aufgestellt. Dabei ist vor allem die auffällige Übereinstimmung der Verteilungsmuster am 3. e-Tag in allen Organen zu beachten.

Ein Beispiel dafür, wie groß die Differenzen im Enzymmuster bei verschiedenen Organen sein können, gibt die P-GLY-DH. Dieses Enzym leitet einen Nebenweg der Glykolyse ein, welcher zur Fettsäurebildung führt. Damit ist es, wie *Bücher* [7] zeigte, in dem nach ihm bezeichneten Zyklus, am $NAD/NADH_2$-Umsatz beteiligt. Daß diese Möglichkeit im Hühnerembryo einzig in der Leber in größerem Umfange, und zwar mit ontogenetisch zunehmender Aktivität realisiert ist, zeigt der Vergleich der Enzymmuster deutlich. In der Skelettmuskulatur entspricht die geringe Aktivität dieses Enzyms der Mitochondrienarmut, und das stimmt wieder mit der früher erwähnten schlechten Ausbildung der Energieproduktion über den Trikarbonsäurezyklus überein.

Beim Betrachten dieser Tatsachen stößt man auf die auch schon von *Richterich* [44] in anderem Zusammenhang aufgeworfene und sicher auch im Hinblick auf die embryonale Entwicklung berechtigte Frage, ob die großen Unterschiede in den Gesamtaktivitäten der glykolytischen Enzyme nicht zu einer Limitierung des Substratflusses durch bestimmte Enzyme führen. Gerade die hier durchgeführten

Messungen zeigen, daß offensichtlich Enzyme in Aktivitäten vorkommen, die durchaus im limitierenden Bereich liegen.

Wir danken Herrn *H. Ebbell* von der Ovomaltine Eierfarm in Oberwangen/BE für die Überlassung des Tiermaterials. Herrn Professor *W. Mosimann* und Herrn PD *W. Huber* verdanken wir wertvolle Ratschläge bei der Aufarbeitung der Embryonen. Der Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung von Arbeitsgemeinschaften sei für die gewährte finanzielle Unterstützung, welche diese Arbeit ermöglichte, bestens gedankt.

Literatur

1. *Beisenherz, G.; Boltze, H. J.; Bücher, Th.; Garbade, K. H.* und *Meyer-Arendt, E.:* Fruktose-1,6-Diphosphataldolase, Glyzerinaldehydphosphatdehydrogenase, Laktatdehydrogenase, Phosphoglyzeratdehydrogenase und Pyruvatdehydrogenase aus Kaninchenmuskel in einem Arbeitsgang. Z. Naturforsch. *8b:* 555 (1953).
2. *Bernhard, C.:* Ann. Sci. Nat. *10:* 111 (1858); zit. Ref. [35].
3. *Bertalanffy, L. v.:* Growth-principles and theory; in: Fundamental aspects of normal and malignant growth, ed. by *W. W. Nowinsky*, p. 137 (Elsevier, Amsterdam 1960).
4. *Boell, E. J.:* Embryonic energy exchange; in: Embryonic nutrition, ed. by *D. Rudnick*, p. 1 (University of Chicago Press 1956).
5. *Bot, G.; Andrássy, K. O.* und *Kovács, E. F.:* G-6-Pase, Phosphorylase und Phosphoglukomutasebildung in der Leber von Säuger- und Geflügelembryonen. Acta Physiol Acad. Sci. hung. *17:* 377 (1960).
6. *Brand, L.; Everse, J.* and *Kaplan, N. O.:* Structural characteristics of dehydrogenases. Biochemistry *1:* 423 (1962).
7. *Bücher, Th.* und *Klingenberg, M.:* Wege des Wasserstoffes in der lebendigen Organisation. Angew. Chem. *70:* 552 (1958).
8. *Cahn, R. D.; Levin, G.; Zwilling, E.* and *Kaplan, N. O.:* Nature and development of lactic dehydrogenases. Science *136:* 962 (1962).
9. *Clark, A. M.:* Carbonic anhydrase activity during embryonic development. J. exp. Biol. *28:* 332 (1951).
10. *Cohen, A. J.:* Studies on glycolysis during the early development of the rana pipiens embryo. Physiol. Zool. *27:* 128 (1954).
11. *Colombo, J. P.; Richterich, R.* und *Rossi, E.:* Serumkreatinphosphokinasebestimmung und diagnostische Bedeutung. Klin. Wschr. *40:* 37 (1962).
12. *Davidson, J.:* Activity of certain metabolic enzymes during development of the chick embryo. Growth *21:* 287 (1957).
13. *Delbrück, A.; Schimassek, H.; Bartsch, K.* und *Bücher, Th.:* Enzymverteilungsmuster in einigen Organen und in experimentellen Tumoren der Ratte und der Maus. Biochem. Z. *331:* 297 (1959).
14. *Fellenberg, R. v.; Eppenberger, H. M.; Richterich, R.* und *Aebi, H.:* Die glykolytischen Enzymmuster von Leber, Niere, Skelettmuskel, Herzmuskel und Großhirn bei Ratte und Maus. Biochem. Z. *336:* 334 (1962).
15. *Haefelfinger, H. R.:* Beiträge zur vergleichenden Ontogenese des Vorderhirns bei Vögeln. (Helbing und Lichtenhahn, Basel 1958).

16. *Hamburger, V.* and *Hamilton, H. L.:* A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morph. *88:* 49 (1951).
17. *Heaton, T.:* The nutritive requirements of growing cells. J. Path. Bact. *29:* 293 (1926).
18. *Hermann, H.:* Studies of muscle development. Ann N. Y. Acad. Sci. *55:* 99 (1952).
19. *Hermann, H.; Konigsberg, U. R.* and *Curry, M. F.:* A comparison of the effects of antagonists of Leucin and Methionine on the chick embryo. J. exp. Zool. *128:* 359 (1955).
20. *Hermann, H.; White, B. N.* and *Cooper, M.:* The accumulation of tissue components in the leg muscle of the developing chick. Comp. Physiol. *49:* 227 (1957).
21. *Holton, M.:* Private communication from the author to ref. [35] (1930).
22. *Kilsheimer, G. S.; Weber, D. R.* and *Ashmore J.:* Hepatic glucose production in developing chicken embryo. Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. *104:* 515 (1960).
23. *Kingsbury, J. W.; Alexanderson, M.* and *Kornstein, E. S.:* The development of the liver in the chick. Anat. Rec. *124:* 165 (1956).
24. *Krogh, A.:* On the rate of development and CO_2-production of chrysalides of Tenebrio molitor at different temperatures. Z. allg. Physiol. *16:* 178 (1914).
25. *Lee, W. H.:* The glycogen content of various tissues of the chick embryo. Anat. Rec. *110:* 465 (1951).
26. *Leslie, J.* and *Davidson, J. N.:* The chemical composition of the chick embryonal cell. Biochem. biophys. Acta *7:* 413 (1951).
27. *Levy, M.* and *Young, N. F.:* Chemistry of the chick embryo. V. J. biol Chem. *175:* 73 (1948).
28. *Lillie, F. R.:* Development of the chick. An introduction to embryology (Holt, Rinehart and Winston, New York 1952).
29. *Linzbach, A. J.;* in: Handbuch allg. Pathol., Vol. 6/1, p. 108, ed. by *Büchner, F.; Letterer, E.* and *Roulet, F.* (Springer, Berlin 1955).
30. *Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.* and *Randall, R. J.:* Protein measurement with Folin phenol reagent. J. biol. Chem. *193:* 265 (1951).
31. *Lussana, F.:* La respiratione dei tessuti negli animali adulti, negli embrioni e nei neonati. Arch. Fisiol. *3:* 113 (1906).
32. *Mahler, H. R.; Wittenberger, M. H.* and *Brand, L.:* Biochemical studies of the development of avian embryo. II. Enzymes of the citric acid cycle. J. biol. Chem. *233:* 770 (1958).
33. *Moog, F.:* The differentiation of enzymes in relation to the functional activities of the developing embryo. Ann. N. Y. Acad. Sci. *55:* 57 (1952).
34. *Moog, F.:* Enzymes: formation and growth; in: Embryonic nutrition, ed. by *Rudnick, D.*, p. 87 (University of Chicago Press, 1956).
35. *Needham, J.:* Chemical embryology (University Press, Cambridge 1931).
36. *Nisselbaum, J. S.* and *Bodansky, O.:* Reactions of human tissue lacticdehydrogenases with antisera to human heart and liver lactic-dehydrogenases. J. biol. Chem. *236:* 401 (1961).
37. *Novikoff, A. B.; Potter, R. van* and *Le Page, G. A.:* Phosphorylating glycolysis in the early chick embryo. J. biol Chem. *173:* 239 (1948).
38. *Pertseva, M. N.:* Lactic acid content in the tissues of the developing chick embryo. Biochim. *26:* 254 (1961).

39. *Plagemann, P. G.; Gregory, K. F.* and *Wróblewsky, F.:* The electriphoretically distinct forms of mammalian lactic dehydrogenase. J. biol. Chem. *235:* 2282 (1960).
40. *Portmann, A.:* Die Entwicklungsperiode vom 11. bis 14. Bruttag und die Verkürzung der Brutzeit bei Vögeln. Vjschr. naturforsch. Ges. Zürich *104:* 200 (1959).
41. *Potvin, R.* et *Aron, M.:* La glycogène hépatique dans l'embryon du poulet. C. R. Soc. Biol. *96:* 267 (1927).
42. *Rashba, E. Ya.:* Ukrain. Biokhim. Zhur. *11:* 31 (1938); zit. Ref. [38].
43. Report of the International Commission of the I.U.B. on Enzymes, München 1959 (Pergamon Press 1961).
44. *Richterich, R.:* Das Enzymmuster der Skelettmuskulatur der Maus bei der neuralen Atrophie und der hereditären Dystrophie (in Vorbereitung).
45. *Rinaudo, M. T.:* Glycogenesis in the liver of chicken embryo. Enzymol. *24:* 230 (1962).
46. *Rudnick, D.* and *Waelsch, W.:* Development of glutamotransferase and glutamic-synthetase in the nervous system of the chicken embryo. J. exp. Zool. *129:* 309 (1955).
47. *Schmalhausen, J.:* Studien über Wachstum und Differenzierung. III. Die embryonale Wachstumskurve des Hühnchens. Roux' Arch. EntwMech. *108:* 322 (1926).
48. *Schmalhausen, J.* und *Stepanowa, J.:* Das embryonale Wachstum des Extremitätenskelettes des Hühnchens. Roux' Arch. EntwMech. *108:* 721 (1926).
49. *Shelley, H. J.:* Blood sugars and tissue carbohydrate in foetal and infant lambs and rhesus monkeys. J. Physiol. *153:* 527 (1960).
50. *Shen, S. C.:* Changes in enzymatic patterns during development. A Symposium on the chemical basis of development (Johns Hopkins Press, Baltimore 1958).
51. *Solomon, J. B.:* Increase of DNA and cell number during morphogenesis of the early chick embryo. Biochim. biophys. Acta *23:* 24 (1957).
52. *Solomon, J. B.:* LDH and MDH in the developing chick embryo. Biochem. J. *70:* 529 (1958).
53. *Solomon, J. B.:* Changes in the distribution of GDH, LDH and MDH in liver cell fractions during development of the chick embryo. Develop. Biol. *1:* 182 (1959).
54. *Stämpfli, H. R.:* Histologische Studien am Wolfschen Körper (Mesonephros) der Vögel und über seinen Umbau zu Nebenhoden und Nebenovar. Rev. Suisse Zool. *57:* 6 (1950).
55. *Tanzer, M. L.* and *Gilvarg, C.:* Creatine and creatinekinase mesurement. J. biol. Chem. *234:* 3201 (1959).
56. *Villee, M.:* The metabolism of human placenta in vitro. J. biol. Chem. *205:* 113 (1953).
57. *Virtanen, A. I.* and *De Ley, J.:* The enzyme activity and nitrogen content of bacterial cells. Arch. Biochem. *16:* 169 (1948).
58. *Wallace, R. A.:* Enzymatic patterns in the developing frog embryo. Develop. Biol. *3:* 486 (1961).
59. *Warburg, O.; Posener, K.* und *Negelein, E.:* Über den Stoffwechsel der Karzinomzelle. Biochem Z. *152:* 309 (1924).

60. *Warburg, O.* und *Christian, W.:* Optischer Nachweis der Hydrierung und Dehydrierung des Pyridins im Gärungskoferment. Biochem. Z. *286:* 81 (1936).
61. *Weiss, P.;* in: The chemistry and physiology of growth, ed. by *Parpart, A. K.*, p. 135 (Princeton University Press, Princeton N. Y. 1949).
62. *Zuppinger, K.; Richterich, R.* und *Rossi, E.:* Die diagnostische Bedeutung der Heterogenität der Serumlaktatdehydrogenase. Schweiz. med. Wschr. *92:* 169 (1962).

Adresse des Autors: Dr. Hans M. Eppenberger, Medizinisch-chemisches Institut der Universität, Bühlstraße 28, *Bern* (Schweiz)

Curriculum vitae

Am 20. Juni 1936 wurde ich, Hans Max Eppenberger, ältester Sohn des Advokaten und Notares Dr. iur. Max Eppenberger und der Irmgard Eppenberger geb. Jolles, in Basel geboren. Ich bin Bürger von Basel und Mogelsberg (Kt. St. Gallen). Ich besuchte das Humanistische Gymnasium in Basel von 1947 bis 1955, in welchem Jahre ich die Schule mit der Maturität abschloß. Vom WS 1955 bis zum WS 1956 studierte ich an der E.T.H., von da ab bis zum SS 1959 an der Universität Basel. Vom WS 1959 bis zum SS 1962 war ich an der Universität Bern immatrikuliert. Ich habe in dieser Zeit die Vorlesungen, Kurse und Praktika folgender Herren Professoren und Privatdozenten besucht: H. Aebi, A. Alder, K. Bernhard, M. Brenner, K. Bucher, H. Dahn, H. Erlenmeyer, E. Flückiger, M. Geiger-Huber, R. Geigy, E. Handschin, P. Huber, F. Laves, A. v. Muralt, H. Nüesch, A. Portmann, V. Prelog, T. Reichstein, R. Schenkel, G. Schwarzenbach, E. Specker, J. Tomscik. Die Dissertation entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. H. Aebi am Medizinisch-chemischen Institut der Universität Bern.